

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Школа Инженерная школа природных ресурсов

Направление подготовки 18.04.01 «Химическая технология»

Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Разработка иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А

УДК 616.36-002.12-097.1

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Крупницкая Юлия Александровна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения химической инженерии	Дорожко Е.В.	К.Х.Н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Маланина В.А.	К.Э.Н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Л. А.			

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Михеева Е.В	К.Х.Н.		

Томск – 2020 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов
Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП

(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Крупницкой Юлии Александровне

Тема работы:

Разработка иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	От 07.05.2020 №128-26/с

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
------------------------------------------	--

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Объекты исследования:</p> <ul style="list-style-type: none"> - иммуноферментные тест-системы с разными схемами иммобилизации антител и антигена на твердой фазе; - очищенные препараты IgG кролика, IgG мыши; - сыворотки мышей, вакцинированных по ГФ XIII ФС.3.3.1.0029.15
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов <i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i>	Введение Литературный обзор Материалы и методы Результаты и их обсуждение Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Социальная ответственность Заключение
Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i>	Схемы, рисунки, таблицы

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

(с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Доцент ОСГН, к.э.н., Маланина Вероника Анатольевна
Социальная ответственность	Старший преподаватель ООД ШБИП, Скачкова Лариса Александровна
Раздел на иностранном языке	Доцент ОИЯ, к.ф.н., Терре Дина Анатольевна

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

- 1.1 Гепатит А
- 1.2 Вакцины
- 1.3 Иммуноферментный анализ (ИФА)
- 1.4 Метод белкового электрофореза в полиакриламидном геле

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	
------------------------------------------------------------------------------------------	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Дорожко Елена Владимировна	к.х.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Крупницкая Юлия Александровна		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
 Уровень образования магистр
 Отделение химической инженерии
 Период выполнения _____ (осенний / весенний семестр 2019 /2020 учебного года)

Форма представления работы:

Магистерская диссертация

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
------------------------------------------	--

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
Январь 2020г.	Литературный обзор	20
Февраль 2020 г.	Получение и очистка биологического материала	20
Март 2020 г.	Отработка оптимальных условий постановки ТИФА	20
Апрель 2020 г.	Обобщение результатов	20
Май 2020 г.	Оформление ВКР	20

СОСТАВИЛ:

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения химической инженерии	Дорожко Е.В.	к.х.н.		

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения химической инженерии	Михеева Е.В	к.х.н.		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Крупницкой Юлии Александровне

Школа	ИШПР	Отделение (НОЦ)	Отделение химической технологии
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Сырье и материалы: 17907,39 руб. Специальное оборудование: 122833,74 руб.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Амортизация: 63489,52 руб. Основная заработная плата: 353080,00 руб.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Отчисление на социальные нужды: 106630,16 руб. Плановая себестоимость: 663940,81 руб.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности проведения поисковых ГРП с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	Предпроектный анализ Диаграмма Исикавы Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования Инициация проекта
2. Планирование и формирование бюджета поисковых ГРП	Планирование управления научно-техническим проектом
3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности поисковых ГРП	Бюджет научного исследования

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
------------------------------------------------------	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Маланина Вероника Анатольевна	к.э.н., доцент		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Крупницкая Юлия Александровна		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ83	Крупницкой Юлии Александровне

Школа	ИШПР	Отделение (НОЦ)	Отделение химической технологии
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Разработка иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<p><i>Объекты исследования:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - иммуноферментные тест-системы с разными схемами иммобилизации антител на твердой фазе; - подбор растворов и условий проведения ИФА; <p><i>Рабочая зона</i> – боксовое помещение №507 производственного корпуса №104 фармацевтической компании АО «Вектор-БиАльгам», г. Новосибирск;</p> <p><i>Область применения</i> – фармацевтическое производство АО «Вектор-БиАльгам», г. Новосибирск</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1.Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> - Трудовой кодекс РФ №197 -ФЗ (с изменениями на 16 декабря 2019 года); - Правила производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) ГОСТ Р 52249-2009; - Пожарная безопасность ГОСТ 12.1.044-89 (ИСО 4589-84); - Электробезопасность ГОСТ 12.1.038-82. - Организация работы лабораторий МУ 1.3.2569-09
2.Производственная безопасность: <ul style="list-style-type: none"> 2.1.Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2.Обоснование мероприятий по снижению воздействия 	<ul style="list-style-type: none"> - отклонение показателей микроклимата в помещении; - недостаточная освещенность рабочей зоны; - потенциально инфекционный материал; - токсические, раздражающие факторы, возникающие при работе с химическими реактивами; - бактерицидные лампы для обезвреживания; - воздействие электрического тока; - пожаровзрывоопасность

3. Экологическая безопасность:	– влияние фармацевтических отходов
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	- химический взрыв; - пожар

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
-------------------------------------------------------------	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Лариса Александровна			

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Крупницкая Юлия Александровна		

Планируемые результаты освоения

Код	Результат обучения	Требования ФГОС ВО, СУОС, критериев АИОР, и/или заинтересованных сторон
Общие по направлению подготовки		
P1	Применять глубокие естественно-научные, математические и инженерные знания для создания новых материалов	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P2	Использовать глубокие знания в области современных технологий химического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК - 2, 4-7, ОПК-3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P3	Ставить и решать инновационные задачи инженерного анализа, связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-2, 14), Критерий 5 АИОР (п. 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, проектировать и использовать новое оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на мировом рынке	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4, 5, 6), Критерий 5 АИОР (п. 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P5	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в области создания новых материалов, современных химических технологий, нанотехнологий	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-1, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.4), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
P6	Внедрять, эксплуатировать современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их высокую эффективность, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4-7), Критерий 5 АИОР (п. 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
Универсальные компетенции		
P7	Использовать <i>глубокие знания по проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной инженерной деятельности</i> с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ПК-8, 13), Критерий 5 АИОР (п. 3.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P8	<i>Активно владеть иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-4, ОПК-1, ОПК-5), Критерий 5 АИОР (п. 3.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве члена и руководителя группы, состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-9, ОПК-2), Критерий 5 АИОР (п. 3.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-6, 10), Критерий 5 АИОР (п. 3.4, 3.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>

P11	Самостоятельно учиться и непрерывно повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-6, ПК-11), Критерий 5 АИОР (3.6), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> .
Профиль Анализ и контроль в биотехнологических и фармацевтических производствах		
P12	Применять глубокие знания в области разработки современных технологий химико-фармацевтического и биотехнологического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i> , требования профессиональных стандартов (40.010 Специалист по техническому контролю качества продукции).

Реферат

Выпускная квалификационная работа 126 с., 17 рисунков, 31 таблица, 78 источников, 1 приложение.

Ключевые слова: твердофазный иммуноферментный анализ; антиген вируса гепатита А; иммунные и неиммунные сыворотки животных; антивидовой конъюгат.

Объектами исследования являются иммуноферментные тест-системы с разными схемами иммобилизации антител и антигена на твердой фазе; иммунные сыворотки животных; очищенные препараты IgG кролика и IgG мыши; сыворотки мышей после вакцинации по ГФ XIII.

Цель работы – разработка качественного непрямого метода иммуноферментного анализа для выявления титра антител, специфичных к вирусу гепатита А, у вакцинированных мышей.

В результате исследования:

1. Разработана схема иммунизации мышей и кроликов
2. Получены вирусспецифические иммуноглобулины экспериментальных животных (IgG кролика и IgG мыши) методами осаждения каприловой кислотой с высаливанием сульфатом аммония и аффинной хроматографией
3. Отработаны условия постановки непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, формат I) и непрямого «сэндвич» твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич» ТИФА, формат II) при сорбции вирусспецифического биологического материала (антиген ВГА/иммуноглобулинов IgG кролика).
4. Проведены сравнительные исследования по эффективности применения двух форматов иммуноферментного анализа антител к вирусу гепатита А: ТИФА I и ТИФА II.

Область применения: фармацевтические компании по производству вакцин (на стадии контроля качества).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АГ – антиген

ВГА – вирус гепатита А

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ОП – оптическая плотность

ПААГ-SDS- полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ

ТМБ - тетраметилбензидин

Оглавление

Введение	14
Глава 1 Литературный обзор	17
1.1 Гепатит А	-
1.1.1 История открытия, симптомы болезни и ее эпидемиология в настоящее время	-
1.1.2 Строение вириона	21
1.1.3 Номенклатура и организация генома	24
1.2 Вакцины против ВГА	26
1.2.1 Характеристика вакцины АЛЬГАВАК® М	30
1.2.2 Характеристика стандарта препарата вакцины против ВГА	31
1.2.3 Основные требования, предъявляемые к контролю качества вакцины для профилактики гепатита А	32
1.3 Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА)	34
1.4 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле	37
Глава 2 Материалы и методы исследования	40
2.1 Оборудование	-
2.2 Материалы	42
2.3 Реактивы и биологический материал	-
2.4 Объекты исследования	44
2.5 Методы	-
2.5.1 Получение антигена ВГА	-
2.5.2 Иммунизация мышей	-
2.5.3 Иммунизация кроликов	45
2.5.4 Метод очистки препаратов иммуноглобулинов (IgG) животных каприловой кислотой с последующим высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония	46
2.5.5 Метод дополнительной очистки препаратов иммуноглобулинов (IgG) кроликов с использованием аффинной хроматографии	-
2.5.6 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-SDS)	47
Глава 3 Результаты исследования и их обсуждение	52
3.1 Характеристика непрямого ТИФА (формат I)	53
3.2 Характеристика непрямого «сэндвич» ТИФА (формат II)	54
3.3 Характеристика антигена ВГА	-

3.4	Получение высокотитражных специфических сывороток экспериментальных животных	56
3.5	Получение препарата очищенных IgG колик и мышей	60
3.6	Отработка оптимальных условий для проведения ТИФА I	63
3.6.1	Выбор полистироловых планшетов для сорбции антигена ВГА/иммуноглобулинов IgG	-
3.6.2	Подбор буферного раствора для сорбции антигена ВГА на планшетах для ТИФА	64
3.6.3	Отработка температурно-временных условий сорбции антигеном ВГА на полистироловых планшетах	65
3.6.4	Отработка концентрации антигена ВГА, сорбированного на планшет для титрования	-
3.7	Отработка оптимальных условий для проведения ТИФА II	66
3.8	Апробация определения антител против ВГА в сыворотке крови мышей с использованием ТИФА I и II	70
Глава 4	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	73
4.1	Предпроектный анализ	-
4.2	Диаграмма Исикавы	-
4.3	Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования	75
4.4	Инициация проекта	-
4.5	Планирование управления научно-техническим проектом	76
4.6	Бюджет научного исследования	79
Глава 5	Социальная ответственность	86
5.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	-
5.1.1	Правовые нормы трудового законодательства	-
5.1.2	Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны	87
5.2	Производственная безопасность	89
5.3	Экологическая безопасность	97
5.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	100
	Заключение	104
	Список использованных источников	105
	Приложение А	112

Введение

Вирус гепатита А циркулирует повсеместно на всех континентах и вызывает одно из самых распространенных заболеваний человека - вирусный гепатит А (ВГА). В мире ежегодно регистрируется около 1,5 млн случаев заражения ВГА [1;2].

В отличие от гепатита В и С инфицирование гепатитом А не приводит к развитию хронической болезни печени и редко заканчивается смертельным исходом, но может вызывать симптомы, ослабляющие здоровье, и молниеносный гепатит (острую печеночную недостаточность), который зачастую является смертельным.

Отдельные случаи заболевания и эпидемии гепатита А происходят во всем мире и имеют тенденцию к цикличности [3].

Специального лечения гепатита А не существует. Восстановление после симптомов инфекции может быть медленным и занимать несколько недель или месяцев.

Наиболее эффективные средства борьбы с гепатитом А — это улучшение санитарии, повышение безопасности пищевых продуктов и расширение охвата вакцинацией.

В настоящее время на международном рынке имеются несколько инъекционных вакцин против ВГА на основе инактивированных и очищенных препаратов ВГА (названия: Havrix, Avaxim, Vaqta), производства Бельгии, Франции и США, соответственно. Вакцины лицензированы для детей в возрасте от одного года и старше. Содержание вирусного антигена различается между вакцинами, однако все они считаются безопасными и иммуногенными. Вакцины похожи друг на друга в плане эффективности и набора побочных эффектов, отличия заключаются в степени очистки и концентрации вирусного антигена [4]. Эти вакцины зарегистрированы и для применения на территории РФ.

В РФ с 1997 г. по 2011 г. выпускалась отечественная вакцина «ГЕП-А-ин-ВАК», которая стимулировала образование в организме специфических антител,

обеспечивая длительный иммунитет. По своим качествам вакцина не отличалась от зарубежных аналогов, профилактическая эффективность составляла 98% [5;6]. С 2011 г. АО «Вектор-Биальгам» выпускает вакцину АЛЬГАВАК®М на основе нового штамма HAV, который отличается более высокой продуктивностью накопления вирусного урожая на перевиваемой культуре клеток линии 4647 при более коротком сроке культивирования. Вирусный штамм аттестован и лицензирован для производства вакцины, инактивированной формалином и сорбированной на гидроокиси алюминия [7].

Такая вакцина должна быть безопасна и содержать большое количество вирусного антигена, чтобы вызвать иммунный ответ и образование антител.

Главная проблема технологии производства инактивированных вакцин и состоит в том, чтобы в дозу было включено достаточное количество вирусного антигена.

Для оценки потенции иммуногенности вакцин необходимо количественное измерение содержания антигена в производственных партиях.

Согласно требованиям фармакопейной статьи ФС.3.31.0029.15 (ГФ XIII) для определения содержания антигена в полуфабрикатных продуктах в промежуточных стадиях производства и готовой вакцине и при определении индукции антител при исследовании иммунного ответа на введение препарата группе экспериментальных животных применяют метод твердофазного иммуноферментного анализа.

ИФА тест-системы могут быть коммерческого или внутреннего производства самих производителей вакцин. Для разработки или усовершенствования имеющихся тест-систем внутреннего производства также необходимы компоненты, коммерческого или внутреннего производства.

Целью данной работы являлась разработка качественного непрямого метода иммуноферментного анализа антител, специфичных к вирусу гепатита А у вакцинированных мышей.

Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать схему иммунизации мышей и кроликов концентрированным препаратом антигена вируса гепатита А с целью получения сывороток, содержащих специфические антитела;

2. На основе полученных сывороток, содержащих специфические антитела, методом осаждения каприловой кислотой с высаливанием сульфатом аммония получить вирусспецифические иммуноглобулины экспериментальных животных;

3. Отработать условия постановки непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, формат I) и непрямого «сэндвич» твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич» ТИФА, формат II) при сорбции вирусспецифического биологического материала (антигена ВГА/иммуноглобулинов IgG кролика):

- выбор полистироловых планшетов;
- подбор разведений при шахматном титровании;
- подбор буферного раствора;
- подбор температурно-временных условий;

4. Провести сравнительные исследования по эффективности применения двух форматов иммуноферментного анализа антител к вирусу гепатита А: ТИФА I и ТИФА II.

Глава 1 Литературный обзор

1.1 Гепатит А

1.1.1 История открытия, симптомы болезни и ее эпидемиология в настоящее время

Гепатиты (*hepatitis*; греч, *hepar*, *hepat[os]* печень) - общее обозначение острых и хронических воспалительных заболеваний печени различной этиологии [8]. Наиболее известный симптом при гепатитах - желтуха, которая возникает, когда билирубин (жёлчный пигмент, который образуется в норме как результат расщепления белков, содержащих гем: гемоглобина, миоглобина и цитохрома) не переработанный в печени, попадает в кровь и придаёт коже характерный желтоватый оттенок [9].

История гепатитов уходит глубоко в древность. Еще в V в. до н.э. Гиппократ писал о заразной форме желтухи. В середине I тысячелетия н.э. в письме папы римского Захарии рекомендовалось изолировать больных желтухой. В XVII-XIX вв., во время войн, эпидемии желтух наблюдались во многих странах Европы и Америки. Эпидемии охватывали большие контингенты войск и сопровождались высокой летальностью. Желтуху называли «солдатской» болезнью, или «военной» желтухой. Эпидемический характер желтухи был подмечен уже в то время, однако недостаточный уровень знаний не позволил даже приблизиться к расшифровке природы этого заболевания [10].

Русский врач-терапевт Боткин С.П. (1832-1889 гг. жизни) в конце XIX столетия (1883-1884 гг.) в своих клинических лекциях, еще до открытия вирусов Ивановским Д.И. (в 1892 г.), пришел к убеждению, что *icterus catarrhalis*, который прежде принимали за желудочно-кишечный катар, на самом деле есть острое инфекционное заболевание. В 1937 г. Финдлей Д. и МакКоллум (McCallum F.O.) в опытах на добровольцах показали, что заражение фильтратами содержимого двенадцатиперстной кишки больных гепатитом, протекающим с желтухой, ведет к развитию аналогичного заболевания. Таким образом, была доказана вирусная

природа болезни, но выделение самого вируса длительное время не удавалось. Вирусная этиология болезни была убедительно обоснована Сергиевым П.Г., Тареевым Е.М. и Гонтаевой А.А. (в 1940 г.) при изучении желтух в Крыму у привитых против лихорадки паппатачи вакциной, как оказалось, содержащей сыворотку крови человека [11].

В 1947 г. McCallum F.O. предложил классификацию гепатитов (болезней): тип А - для инфекционного заболевания, передаваемого через зараженные продукты, воду и фекально-оральным путем (через грязные руки) от человека к человеку; тип В - для сывороточного заболевания (т.е. передаваемого через кровь) [12; 13], что оказало огромное влияние на изучение и дифференцировку этих заболеваний. Идея Боткина С.П. об инфекционной природе желтухи блестяще подтвердилась после открытия Блумбергом Б. (Blumberg B.) в 1964 г. так называемого австралийского антигена у аборигенов в Австралии. Этот белок (HbsAg) оказался поверхностным антигеном вируса, вызывающего гепатит В. Вскоре, в 1970 г., Dane D. обнаружил в крови и в ткани печени больного желтухой вирус, представленный сферическими и полигональными образованиями (их называли частицами Дейна), обладающими инфекционностью и разнообразной антигенностью. Вирус называли гепатит В [14].

В 1973 г. Feinstone S. в фекалиях больного инфекционным гепатитом А (в острой фазе заболевания) методом электронной микроскопии идентифицировал этиологический агент болезни - вирус в виде сферических 27-нанометровых частиц, который также называли в честь вызываемой болезни – вирус гепатита А [15;16]. Позднее были обнаружены вирусы гепатитов - Д, Е, С и др. Все эти патогены приводят к тяжёлому поражению печени, но отличаются друг от друга по строению вирусной частицы и её генетического материала (т.е. относятся к разным вирусным семействам), по механизму заражения и путям передачи, патогенезу и иммуногенезу, клиническим проявлениям и тяжести течения болезни, с вероятностью перехода в хроническую форму и раковые заболевания [17].

Вирусный гепатит А (ВГА) или болезнь Боткина - антропонозная инфекционная болезнь, т.е. развивающаяся только в человеке. Источником инфекции являются вирусоносители и больные, в конце инкубационного периода (который длится от 7 до 50 суток), особенно в дожелтушный период. Выделение вируса с фекалиями начинается как раз в этот период [18].

Этиологический агент этой болезни - **вирус гепатита А**, относительно устойчив во внешней среде: может сохраняться в течение нескольких месяцев при температуре 4°C, несколько лет при минус 20°C и несколько недель при комнатной температуре. Вирус инактивируется при кипячении в течение 5 мин и в течение часа при концентрации 0,5 – 1,5 мг/л остаточного хлора в воде [18]. ВГА обладает высокой контагиозностью: для заражения достаточно всего несколько инфекционных частиц. В подавляющем большинстве случаев (около 95%) вирус внедряется в организм человека через рот и далее попадает в желудок. Будучи кислотоустойчивым, легко преодолевает желудочный барьер, поступает в тонкую кишку, всасывается в кровь и по системе воротной вены достигает печени, в клетках которой осуществляется его репликация. На мембране гепатоцитов есть соответствующие вирусу рецепторы, к которым он прикрепляется и проникает внутрь печеночной клетки. В цитоплазме гепатоцита происходит декапсидация вируса, высвобождается вирусная РНК и начинается ее транскрипция. Вирусные белки синтезируются и собираются в новые капсиды, каждый из которых содержит дочерние молекулы РНК. Часть вновь образованных вирусных частиц поступает с желчью в фекалии и выделяется из организма, другая инфицирует соседние гепатоциты. Иммуитет после перенесенного заболевания прочный и длительный, практически пожизненный [1].

Основные клинические признаки болезни: начало острое, повышение температуры тела до 39°C, головная боль, боль в мышцах, снижение аппетита, тошнота, рвота, отрыжка горечью, тупые боли в правом подреберье, потемнение мочи, светлый кал, желтушность кожных покровов и слизистых оболочек на 5 -

7 сутки болезни, увеличение печени, реже - селезенки [18]. Осложнения для ВГА не характерны, самое тяжелое из них - печеночная кома - встречается очень редко. Среди возможных осложнений следует иметь в виду функциональные и воспалительные заболевания желчных путей. У лиц с нарушением функции Т-супрессоров во время и/или после перенесенного заболевания может развиваться активный аутоиммунный гепатит первого типа. Летальный исход от ВГА представляет исключительную редкость, но, тем не менее, возможен у лиц старших возрастных групп и пациентов с предшествующими заболеваниями печени (алкогольной болезнью печени, хроническими гепатитами различной этиологии). Причиной смерти может быть отек мозга у больных с острой печеночной недостаточностью, острая печеночная энцефалопатия. ВГА является одним из самых распространенных заболеваний человека на всех континентах (рис. 1.1). В мире ежегодно регистрируется около 1,5 млн случаев. Характерные эпидемиологические особенности - осенняя сезонность и периодичность: подъем заболеваемости регистрируется обычно каждые 5 - 6 - 10 лет. В тропических и субтропических регионах сезонность не выражена или приурочена к периоду дождей [1]. Роспотребнадзор рекомендует делать прививку за 2 - 4 недели до поездки в эндемичные районы мира и не благополучные ВГА территории РФ (рис. 1.2) [19].

РФ в целом относят к регионам со средней эндемичностью по ВГА, а в этиологической структуре вирусных гепатитов он занимает доминирующее положение (55,3 % в 2009 г., 62,1 % в 2012 г.). По сравнению с 2001 г. показатель заболеваемости ВГА в РФ в 2012 г. возрос на 27% (среди детей на 30%), что значительно выше, чем во многих странах Европы и в США. Частота присоединения ВГА к хроническим гепатитам В и С составляет от 1 до 4,8% (в Москве и Санкт-Петербурге – 11 - 16,3%, соответственно). В нашей стране, по оценкам экспертов, общее число лиц, инфицированных вирусами гепатита В и С, может достигать 8 - 10 млн и 30 - 40% из них могут быть восприимчивы к ВГА [1].



Рисунок 1.1 – Распространение вируса гепатита А в различных странах мира (2016г.)

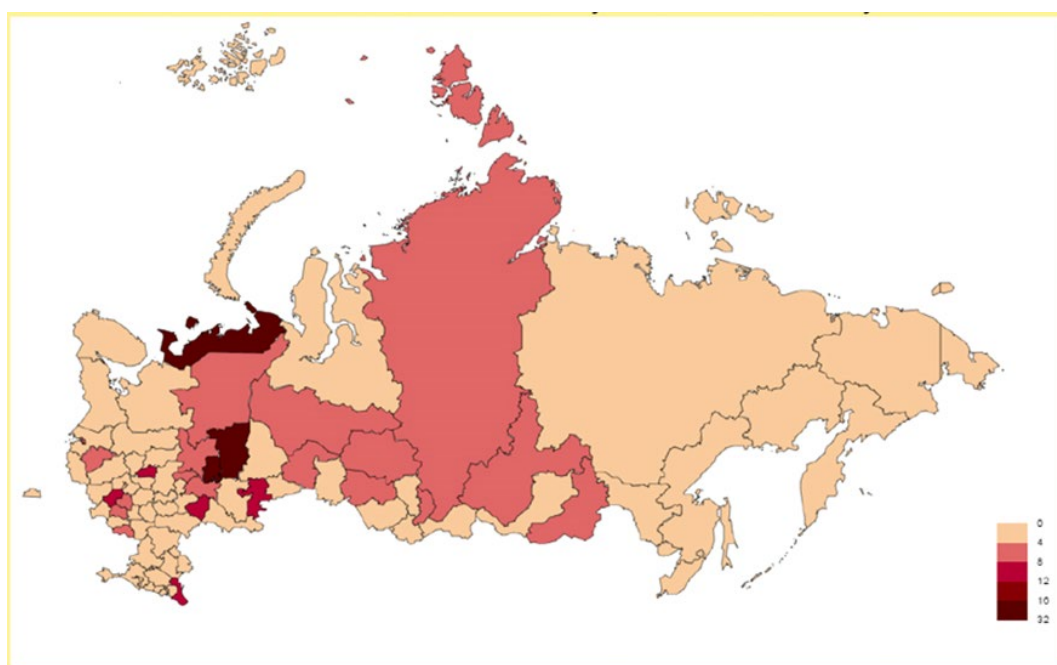


Рисунок 1.2 – Уровень заболеваемости гепатитом А на территории России (2016г.)

1.1.2 Строение вириона

ВГА по строению – это простой вирион (размером 100 нм) без оболочки [20], поэтому не содержит липидов и углеводов. Диаметр вириона равен 27 нм, капсид (белковая капсула) имеет икосаэдрический тип симметрии (рис. 1.3) и содержит 60 структурных единиц (капсомеров). Каждая структурная единица капсида построена из 4-х полипептидов: VP1, VP2, VP3, VP4. Первые три них

(VP1, VP2, VP3) располагаются на поверхности вириона, а VP4, вероятно, лежит внутри вирусной частицы и имеет тесный контакт с геномной РНК [21]. При электронно-микроскопическом исследовании поверхностная морфология вирионов ВГА не видна (рис. 1.4), но кристаллическая структура (рис. 1.5) была разрешена [22].

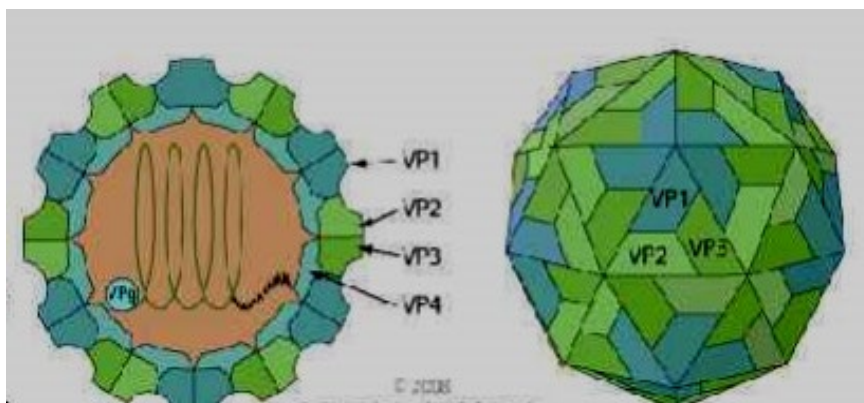


Рисунок 1.3 - Икосаэдрический тип симметрии капсида ВГА [21]

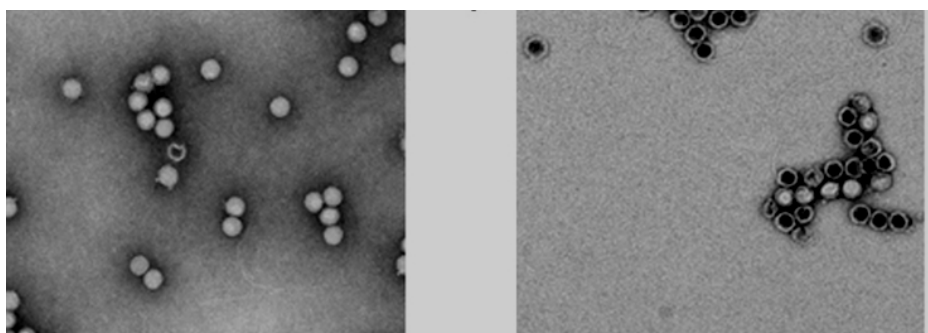


Рисунок 1.4 - Электронно-микроскопическое исследование поверхности вирионов ВГА, по данным [22].

Примечания: слева фракция, содержащая полные вирионы; справа фракция пустых вирионов (без РНК) (пояснения см. ниже к рис. 1.6 и 1.7)

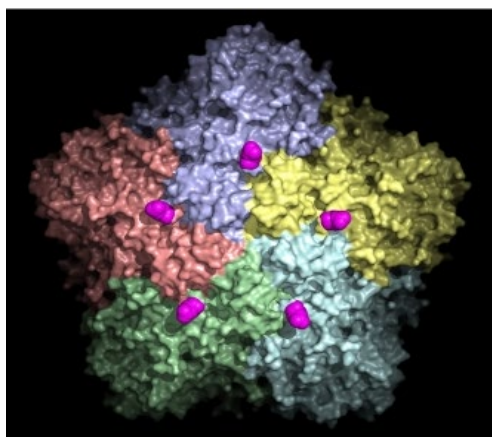


Рисунок 1.5 - Форма кристаллической структуры вириона ВГА, по данным [22].

Для очистки ВГА использовали ультрацентрифугирование в градиентах плотности сахарозы в концентрациях от 15 до 45% в течение 3,5 ч, как описано в методиках. Вирусный препарат был разделен на две фракции и, соответственно, на два преобладающих типа частиц; один был расположен на ~27%, другой - на ~32% сахарозы, соответственно. Коэффициент поглощения ($\lambda 260/\lambda 280$) составил 0,76 для верхней полосы и 1,66 для нижней полосы, что указывает на то, что первая содержит в основном пустые частицы (без РНК), а вторая - полные частицы (рис. 1.6). Электрофоретическое разделение этих фракций (легкой и тяжелой) (рис. 1.7) показало наличие вирусных белков VP1, VP2, VP3 и VP4 с молекулярным весом от 8 до 30 кДа, а также присутствие конгломератов молекул нерасщепленного полипротеина (VP0) с молекулярным весом выше 50 кДа [22].

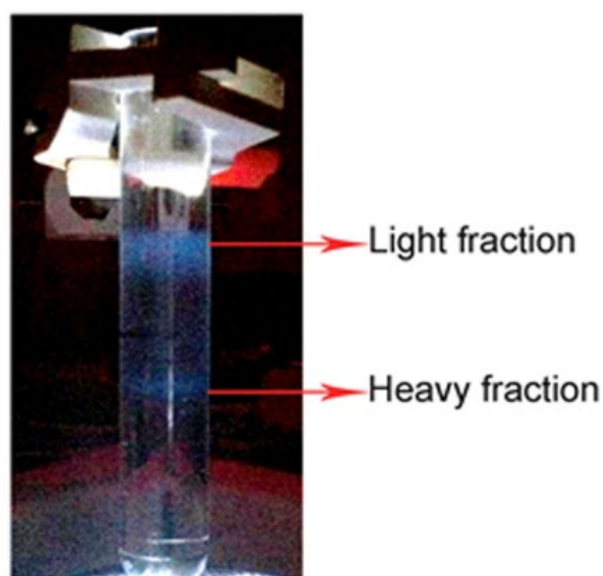


Рисунок 1.6 - Расслоение частиц ВГА в градиентах плотности сахарозы, по данным [22].
Примечание: light fraction - легкая фракция, содержащая пустые вирионы (без РНК);
heavy fraction – тяжелая фракция, содержащая полные вирионы.

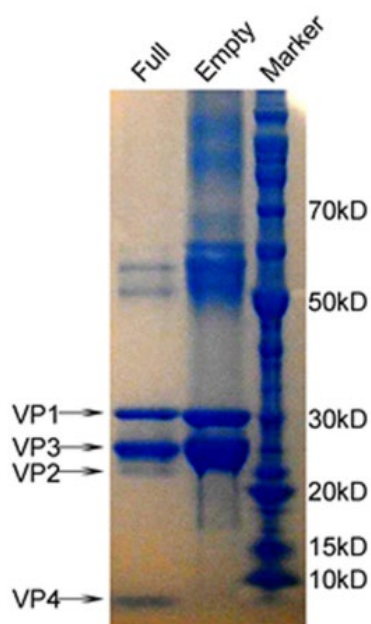


Рисунок 1.7 - Электрофоретическое разделение фракций очищенного препарата ВГА, по данным [22].

Примечание: 12%-ный гель с SDS (додecilсульфат натрия); каждая полоса загружена образцом по 5-10 мкг (полоса 1 - полные (full) вирусные частицы; 2 - пустые (empty) частицы; 3-маркеры белкового веса. Стрелками указано местоположение вирусных белков - VP1, VP2, VP3 и VP4, соответственно.

1.1.3 Номенклатура и организация генома

ВГА принадлежит к роду *Hepatovirus* семейства *Picornaviridae* [23]. По данным Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), на март 2017 г. семейство *Picornaviridae* содержит 35 родов [24], в которые включено 80 видов и более 500 типов вирусов. Хотя подавляющее большинство инфекций, вызываемых этими патогенами, остаются бессимптомными, многие пикорнавирусы вызывают у человека и животных заболевания, поражающие центральную нервную систему, дыхательные и желудочно-кишечные тракты, сердце, печень, поджелудочную железу, кожу и глаза [20]. Особенно опасны ящур и полиомиелит (детский спинномозговой паралич) [25].

Название семейства *Picornaviridae* происходит от слияния двух слов: латинского - *pico* (маленький) и английского – *RNA* (РНК), означая «вирусы с короткими геномными РНК», т.к. их геном, который содержит 7,0 - 8,8 тыс. н.о. Геном представлен линейной однонитевой молекулой плюс-РНК, выполняющей

также функции информационной (т.е. матричной) РНК и обладающей инфекционностью [25]. Как и у других пикорнавирусов, геном ВГА можно разделить на три отдельных участка (рис. 1.8). 5' UTR участок (untranslated region, нетранслируемый регион н.о. на 5' - конце генома) содержит обширную вторичную структуру, ковалентно связанную с вирусным белком VPg и необходимую для Cap-независимой трансляции. Одна открытая рамка считывания (open reading frame) кодирует все вирусные белки: структурные (VP1, VP2, VP3 и VP4) и неструктурные белки, связанные с репликацией [26]. 3' UTR участок генома заканчивается поли (А) трактом (фрагментом, азотистые основания которого представлены только аденином), играющим важную роль в транспорте мРНК, её трансляции и стабильности).

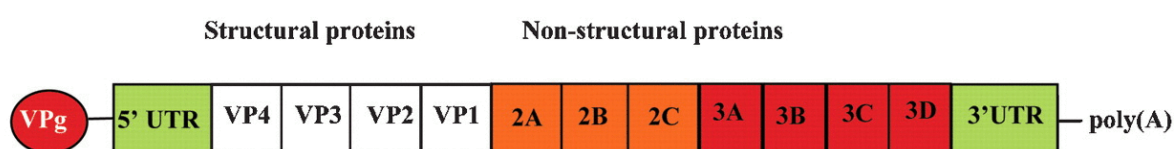


Рисунок 1.8 - Схема генома ВГА, по данным [26]

Примечание: Structural proteins – структурные белки

Non-structural proteins - неструктурные белки

Сравнение последовательностей н.о. 152 изолятов ВГА дикого типа или штаммов, полученных при адаптации к клеточным культурам, показало, что эти вирусы могут быть генетически дифференцированы на семь уникальных генотипов (I-VII). При этом последовательность н.о. геномов разных генотипов отличается на 15 - 25%. Четыре генотипа (I, II, III и VII) были выделены только от людей, в то время как три других генотипа (IV, V и VI) были выделены только от обезьян разных видов, у которых в неволе развивалось ВГА-подобное заболевание [27].

Человеческие генотипы (I-III) ВГА имеют выраженное географическое распределение. Например, генотип I наиболее распространенный тип во всем мире, особенно генотип IA, который включает вирусные изоляты из Северной

Америки, Китая, Японии, бывшего СССР и Таиланда [27;28]. Изоляты ВГА из Центральной и Южной Америки принадлежат к субгенотипу IA, что позволяет предположить наличие циркулирующей эндемичной популяции в этих странах [28]. Выявлена со-циркуляция субгенотипов IA и IB в Бразилии [29] и в Южной Африке [30]. Субгенотип IB ВГА был выделен из моллюсков, импортированных из Перу [31]. Генотип IB имеют изоляты ВГА из Иордании, Северной Африки, Австралии, Европы и Японии. В Европе наблюдается более сложная картина, поскольку изоляты ВГА происходят от нескольких генотипов, вероятно, представляющих вирусы, завезенные из других регионов [27].

Генотип III ВГА имеет два подгенотипа (IIIA и IIIB). Прототипный штамм RA21 генотипа IIIA, был распространен среди потребителей внутривенных наркотиков в Швеции в 1980-х гг. и в Норвегии в конце 1990-х гг. Вирусные изоляты, тесно связанные с этим генотипом, были выделены от людей в Индии, Шри-Ланке, Непале, Малайзии и США. Генетический анализ изолятов ВГА, выделенных из проб окружающей среды, например, из моллюсков во Франции, испанских образцов сточных вод и мидий, импортированных в Италию, впервые выявил наличие штаммов, тесно связанных с генотипом IIIA в этих странах [26].

Пока не получено убедительных доказательств существования корреляции между вирусным генотипом и тяжестью ВГА. Все известные изоляты ВГА относятся к одному серотипу, что обеспечивает развитие перекрестного протективного иммунитета и эффективность вакцинации [1]. В антигенном отношении ВГА является однородным, его антигенная активность обусловлена тремя поверхностными капсидными белками (VP1, VP2, VP3), которые представляют собой единый вирусспецифический антиген (ВГА-Аг) [21].

1.2 Вакцины против ВГА

Восстановление после болезни, вызванной ВГА, может быть медленным и занимать несколько недель или месяцев. Специфического лечения при ВГА нет, поэтому наиболее эффективные средства борьбы с этой инфекцией – соблюдение правил личной гигиены (мытье рук перед едой и после посещения

туалета), обеспечение населения безопасной питьевой водой и пищевыми продуктами, а также расширение охвата вакцинацией. ВОЗ рекомендует включить всеобщую массовую вакцинацию против ВГА в национальные планы иммунизации детей в возрасте ≥ 1 года, если это оправдано на основе данных по эндемичности региона. Эта рекомендация была выполнена в нескольких странах - Аргентине, Бельгии, Китае, Греции, Израиле, Панаме, Уругвае и США [32]. Например, в США заболеваемость, связанная с ВГА, была снижена благодаря всеобщей вакцинации детей на протяжении 22-х летнего срока [33].

Havrix - первая коммерчески доступная вакцина была запущена в производство в 1992 г. фирмой GlaxoSmithkline в Бельгии [34]. В настоящее время на международном рынке имеются несколько инактивированных инъекционных вакцин против ВГА (табл. 1.1). Эти вакцины зарегистрированы и для применения на территории РФ [35]. Существует несколько моновалентных инактивированных вакцин, которые лицензированы для детей в возрасте от одного года и старше. Содержание антигена различается между вакцинами, однако все они считаются безопасными и иммуногенными. Вакцины похожи друг на друга в плане эффективности и набора побочных эффектов, отличия заключаются в степени очистки и концентрации. Длительная персистенция антител в крови была показана при использовании 2-дозовых схем вакцинации у взрослых [32]. Большинство стран используют против ВГА инактивированные вакцины, живая аттенуированная оральная вакцина в основном используется в Китае [36;37].

Таблица 1.1 - Вакцины против ВГА, зарегистрированные для использования в РФ

название	производитель	штамм HAV	культура клеток	инактивация/ адсорбция	концентрация вирусного антигена в одной дозе
Havrix	GlaxoSmithkline, Бельгия.	HM175	MRS5	формалин/ гидроокись алюминия	720 ЕД (детская) 1440 ЕД (взрослая)

Avaxim	Pasteur Merieux Connaught, Франция	GBM	MRS5	формалин/ гидроокись алюминия	160 ЕД
Vaqta	Merck, США	CR326	MRS5	формалин/ гидроокись алюминия	25 ЕД (детская) 50 ЕД (взрослая)
ГЕП-А-ин-ВАК	ГНЦ ВБ «Вектор», АО «Вектор- Биальгам», РФ	ЛБА-86- HAS15/4647	4647	формалин/ гидроокись алюминия	50 ЕД
АЛЬГАВАК® М	АО «Вектор- Биальгам», РФ	HAV № ВБГ-07	4647	формалин/ гидроокись алюминия	160 ЕД (детская) 320 ЕД* (взрослая)

Примечания: MRS5 - диплоидные клетки человека;

4647 – перевиваемые клетки почек зеленой мартышки;

ЕД – единица действия (или МЕ – международная единица) – в фармакологии единица измерения дозы вещества, основанная на его биологической активности; в данном случае определение методом твердофазного иммуноферментного анализа, ИФА (ELISA) [38].

Havrix – производитель GlaxoSmithkline, Бельгия. Разработчики: Andre, et al. [39]; (вакцина имеет состав: формальдегид – 100 мкг; алюминия гидроксид – 0,5 мг; консервант (2-феноксиэтанол) – 0,5 % в отношении веса к объему; стабилизатор (полисорбат 20) – 0,3 % в отношении веса к объему; антибиотик (сульфат неомидина) – следовые количества.

Avaxim – владелец лицензии на производство и продажу препарата - Pasteur Merieux Connaught, Франция. Разработчики: J. Graff et al. [40]; (вакцина имеет состав: формальдегид – 12,5 мкг; алюминия гидроксид – 0,3 мг; консервант (2-феноксиэтанол) – 2,5 мкл; среда Hanks 199 (содержит аминокислоты, минеральные соли в воде для инъекций).

Vaqta – производитель компания MERCK & CO., Inc., США. Разработчики: Hennessey Jr., et al. [41]; (вакцина имеет состав: формальдегид – <0,5 мкг/мл; суммарный белок – <0,1 мкг/мл; клеточная ДНК – <4 пкг/мл; бычий сывороточный альбумин – <0,1 нг/мл; алюминия гидроксид – 0,45 мг/мл; рН стабилизатор (борат Na) – 70 мкг/мл).

ГЕП-А-ин-ВАК – производитель ЗАО «Вектор-БиАльгам», Российская Федерация. Разработчики: Мунтянова М.А. и др., [5;6]; (вакцина имеет состав: формальдегид – <0,15 мг/мл; алюминия гидроксид – 0,5 мг/мл; 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор; не содержит консервантов и антибиотиков).

АЛЬГАВАК® М – производитель АО «Вектор-БиАльгам», Российская Федерация. Разработчики: Мунтянова М.А. и др [7]; (вакцина имеет состав: алюминия гидроксида 0,5 мг/мл, не более 0,15 мг формальдегида и 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор).

* - данные по ЕД приведены из официальной инструкции по применению, зарегистрированной в Минздравом РФ [42].

Как видно из данных, представленных в табл. 1.1, концентрации антигена ВГА отличаются в вакцинах разных производителей. Но все они представлены в единицах действия (ЕД, соответствующих ME – международным единицам, на английском языке – unit international, UI), как принято в фармакологии для единицы измерения дозы вещества, основанной на его биологической активности. В данном случае ЕД определены тест-системами на основе метода твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) коммерческого или собственного производства [7;38]

Таблица 1.2 - Возрастные ограничения, дозы, схемы вакцинации и продолжительность иммунитета при использовании вакцин против ВГА

название	возраст	доза	график	продолжительность действия
Havrix	дети 1 – 16 лет	0,5мл	две прививки с интервалом 6–12 месяцев	до 20 лет
	взрослые 16 – 55 лет	1мл		
Avaxim	детям и взрослым с 2 до 55 лет	0,5мл	две прививки с интервалом 6 – 18 месяцев	до 10 лет
Vaqta	дети 1 – 18 лет	0,5мл	две прививки с интервалом 6 – 18 месяцев	в течение 6 лет
	взрослые 18 – 55 лет	1мл		
ГЕП-А-ин-ВАК	дети 3 – 17 лет	0,5мл	две прививки с интервалом 6-12 месяцев	5-6 лет
	взрослые 17 – 55 лет	1 мл		
АЛЬГАВАК® М	Дети 3 – 17 лет	0,5 мл	две прививки с интервалом 6-12 месяцев	от 10 до 15 лет
	взрослые 18 – 50 лет	1 мл	две прививки с интервалом 6-12 месяцев	

Из таблицы 1.2 видно, что иммунизация детей и взрослых у всех вакцин включает две инъекции. Период между первой прививкой и ревакцинацией составляет от 6 до 12 месяцев, у вакцин «Аvaxim» и «Vaqta» от 6 до 18 месяцев.

Ни одна вакцина не лицензирована для детей младше 1 года.

Вакцинация любой из них обеспечивает защиту организма от гепатита А почти на 100 %, но продолжительность действия разная.

1.2.1 Характеристика вакцины АЛЬГАВАК® М

В нашей стране исследования по созданию средств вакцинопрофилактики ВГА были начаты в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН в начале 80-х гг. В качестве исходного материала для получения инактивированной вакцины был выбран штамм HAS15, культивируемый на перевиваемой культуре 4647 (клеток почек зеленой мартышки). Была разработана принципиальная технологическая схема приготовления вакцины, изготовлены и изучены первые лабораторные серии инактивированной культуральной вакцины «ГЕП-А-ин-ВАК». После успешной лабораторной аттестации и первых клинико-иммунологических испытаний разработка вакцины в лабораторном варианте была передана в ГНЦ ВБ «Вектор», где при поддержке АО «Биопрепарат» началась подготовка материальной базы производства в промышленных масштабах инактивированной вакцины, соответствующей требованиям ВОЗ, с целью внедрения ее в практику российской медицины. Готовая вакцина «ГЕП-А-ин-ВАК» представляла собой взвесь инактивированных очищенных вирионов, адсорбированных на гидроксиде алюминия (его содержание от 0,5 до 0,65 мг/мл). С 1997 года по октябрь 2011 года в ГНЦ ВБ «Вектор» и АО «Вектор-Биальгам» было организовано производство первой отечественной вакцины, которая стимулировала образование в организме специфических антител, обеспечивая устойчивый стойкий и длительный иммунитет (на протяжении как минимум 10-15 лет). По своим качествам вакцина «ГЕП-А-ин-ВАК» не отличалась от зарубежных аналогов, профилактическая эффективность составляла 98% [5;6].

Позднее в АО «Вектор-Биальгам» получен новый штамм ВГА № ВБГ-07 с более высокой продуктивностью накопления вирусного урожая и более коротким сроком культивирования на перевиваемой культуре 4647. Штамм аттестован и лицензирован для производства вакцин, инаktivированных формалином и сорбированных на гидроокиси алюминия. Содержание антигена ВГА в одной дозе вакцины оценивалось в ИФА единицах (ЕД) – не менее 80 ЕД для взрослых и не менее 40 ЕД для детей. Использовали ТИФА тест-систему «Вектогеп-А-антиген» собственного производства [7]. С 2011 г. на основе штамма ВГА № ВБГ-07 выпускается вакцина АЛЬГАВАК®М (рис. 1.9). В инструкции (от 16 мая 2019 г.) по применению вакцины 1 прививочная доза для взрослых (1 мл) содержит инаktivированный антиген вируса гепатита А (АГ ВГА) - не менее 320 ИФА ЕД, 1 прививочная доза для детей (0,5 мл) содержит инаktivированный антиген вируса гепатита А (АГ ВГА) - не менее 160 ИФА ЕД [43].



Рисунок 1.9 - Вакцина АЛЬГАВАК®М

1.2.2 Характеристика стандарта препарата вакцины против ВГА

По литературным данным, в 2009 г. был разработан эталонный препарат вакцины на основе инаktivированного ВГА и принят за стандарт на сессии Европейской фармакопеи для анализа и сравнения содержания антигена в производственных партиях вакцин методом ТИФА. Рекомендованная концентрация антигена в одной дозе вакцины – не ниже 12 ЕД при сравнении с

европейским стандартом [44]. В 2016 г. принят первый китайский национальный стандарт с содержанием антигена в 70 ЕД [45].

По данным свидетельства на стандартный образец предприятия вакцины против ВГА «АЛЬГАВАК®М» содержание антигена вируса гепатита А составляет $373,33 \pm 38,81$ ИФА ЕД в 1 мл.

1.2.3 Основные требования, предъявляемые к контролю качества вакцины для профилактики гепатита А

Требования, предъявляемые к вакцине для профилактики гепатита А культуральной очищенной концентрированной абсорбированной инактивированной жидкой, согласно ФС.3.31.0029.15 ГФ XIII [46], представлены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 - Требования, предъявляемые к вакцине для профилактики гепатита А

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный, ГФ XIII	Слегка опалесцирующая суспензия, при отстаивании разделяется на 2 слоя: верхний – прозрачная, бесцветная жидкость; нижний – осадок белого цвета, легко разбивающийся при встряхивании, без образования хлопьев и посторонних включений
Подлинность	Биологический, Метод иммуноферментного анализа, ГФ XIII	Препарат должен быть идентичным антигену вируса гепатита А и должен индуцировать у мышей образование антител к вирусу гепатита А
pH	Потенциометрический, ГФ XIII	От 7,0 до 7,6
Извлекаемый объем	Волюметрический, ГФ XIII	Не менее номинального (0,5 мл; 1 мл)
Проходимость через иглу	Визуальный, ГФ XIII	Суспензия вакцины должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8x40
Седиментационная устойчивость	Визуальный, ГФ XIII	Суспензия вакцины, образующаяся при встряхивании, не должна

		расслаиваться в течение не менее 5 мин
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XIII	Вакцина должна быть стерильна
Пирогенность	Биологический, ГФ XIII	Вакцина должна быть апиrogenной
Аномальная токсичность	Биологический, ГФ XIII	Вакцина должна быть не токсичной
Специфическая активность: Определение содержания АГ ВГА или Иммуногенная активность	Метод иммуноферментного анализа, ГФ XIII Биологический, ГФ XIII	Должно быть не менее 320 ИФА ЕД в 1 дозе вакцины для взрослых и не менее 160 ИФА ЕД в 1 дозе вакцины для детей. Отношение содержания АГ ВГА в 1 мл вакцины к содержанию АГ ВГА в СОП № ОБТК 065* должно находиться в пределах от 0,66 до 1,66. ИД ₅₀ должна составлять не менее 6 Отношение ИД ₅₀ в испытуемой вакцине к ИД ₅₀ в СОП № ОБТК 065 должно находиться в пределах от 0,33 до 3
Полнота сорбции антигена	Метод иммуноферментного анализа, ГФ XIII	Количество несвязанного антигена ВГА в вакцине должно быть не более 6% от общего количества антигена ВГА
Вещества, вносимые в препарат: 1. Формальдегид 2. Алюминия гидроксид (в пересчете на Al ⁺³)	Колориметрический, ГФ XIII Комплексонометрический, ГФ XIII	Не более 0,15 мг/мл От 0,35 до 0,65 мг/мл
Производственный штамм		Штамм ЛБА-86
Упаковка	По 0,5 мл (1 детская доза); 1 мл (1 взрослая доза) в ампулах. По 10 ампул с вкладышем «змейка» из картона в коробки из картона с инструкцией по применению и скарификатором ампульным (если необходим)	
Маркировка	В соответствии с НД	
Транспортирование	В соответствии с СП 3.3.2.3332-16 [47] при температуре от 2 до 8°С. Не замораживать	
Хранение	В соответствии с СП 3.3.2.3332-16 [47] при температуре от 2 до 8°С. Не замораживать	
Срок годности	2 года	

Согласно данным таблицы 1.3 три показателя качества профилактической вакцины контролируется методом твердофазного иммуноферментного анализа: оценка подлинности, специфическая активность (определение содержания АГ ВГА или иммуногенная активность) и полнота сорбции антигена.

1.3 Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА)

Иммуноферментный анализ при производстве и контроле качества вакцины применяют как для определения содержания антигена в полуфабрикатных продуктах в промежуточных стадиях производства и готовой вакцине, так и при определении индукции антител при исследовании иммунного ответа на введение препарата группе экспериментальных животных.

Количественное измерение содержания антигена в производственных партиях необходима для оценки потенции иммуногенности вакцин. В 1997 г. была принята европейская фармакопейная статья о «золотом стандарте» анализа этой потенции *in vivo* на мышах. Т.е. эффективность каждой партии вакцины определяется при измерении в ТИФА уровня специфических антител, индуцированных при иммунизации животных. И этот уровень специфических антител сравнивается с уровнем активности при иммунизации животных стандартным препаратом вакцины. Либо со стандартным коммерческим препаратом антител [48]. Для сравнения иммуногенности вакцин (выявления титров антител) используют готовые ТИФА тест-системы коммерческого или собственного изготовления, или коммерческие компоненты для проведения ТИФА [49;50].

Твердофазный ИФА основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов связан с твердой подложкой, а другой конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически (рис. 1.10).

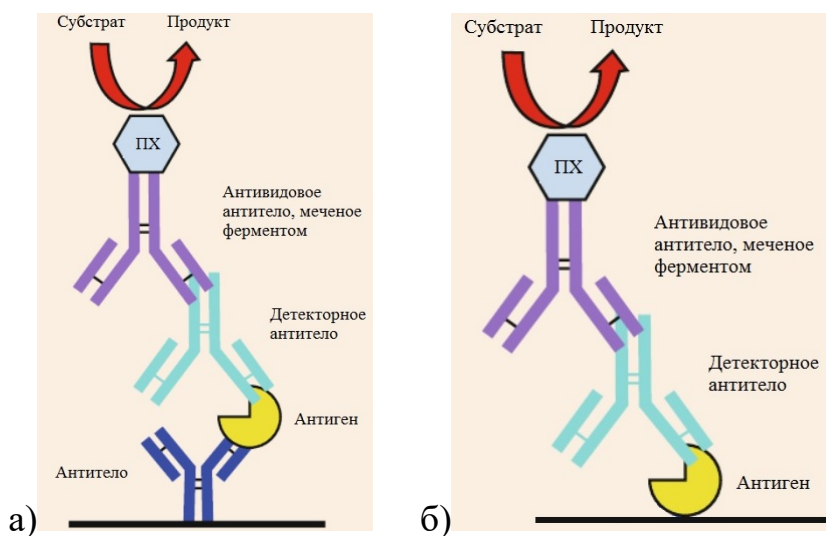


Рисунок 1.10 – Форматы ТИФА для выявления антител
 а) Непрямой «сэндвич» ТИФА;
 б) Непрямой ТИФА

Теоретически ТИФА основывается на данных современной иммунохимии и химической энзимологии, знании физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на главных принципах аналитической химии. Чувствительность ТИФА и время его проведения определяется несколькими основными факторами: кинетическими, термодинамическими характеристиками реакции антиген-антитело, соотношением реагентов, активностью фермента и разрешающей способностью методов его детекции. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой: $[AT] + [AG] \leftrightarrow [ATAГ]$. Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ТИФА, обуславливают разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода [51].

Любой вариант ТИФА содержит 3 обязательные стадии:

1. Стадия узнавания исследуемого соединения специфическим антителом;
2. Стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;
3. Стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал.

В реакции участвуют:

- Твердая фаза;
- АГ и АТ;
- Конъюгат (антиген или антитело, меченые ферментом);
- Ферментный маркер;
- Субстрат;
- Стоп-реагент (чаще всего применяют серную кислоту).

Твердая фаза

В качестве твердой фазы для проведения ИФА можно применять различные материалы: полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и другие. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и др. планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки.

Антигены и антитела

АГ и АТ, используемые в ИФА, должны быть высокоочищенными и высокоактивными. АГ должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант.

Чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител. Используемые АТ могут быть поли- или моноклональными, различного класса (IgG или IgM) и подкласса (IgG1, IgG2).

Чувствительность и специфичность метода повышается при использовании моноклональных антител. В этом случае появляется возможность обнаруживать низкие концентрации АГ (АТ) в образцах.

Ферментные маркеры: наибольшее применение нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза.

Субстраты

Выбор субстрата, в первую очередь, определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция «фермент-субстрат» высокоспецифичная.

Для пероксидазы хрена в качестве субстрата используют 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ хромоген). Происходит цветная реакция,

интенсивность которой зависит от количества связанного определяемого вещества.

Для щелочной фосфатазы субстратом является 4-нитрофенилфосфат.

β -D-галактозидаза катализирует гидролиз лактозы с образованием глюкозы и галактозы [52].

1.4 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле

Для контроля чистоты иммуноглобулинов используется электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез белков

Метод основан на том, что при определённом значении pH и ионной силы раствора белки двигаются в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, двигаются к аноду (+), а положительно заряженные белки - к катоду (-).

Электрофорез в полиакриламидном геле (сокр. электрофорез в ПААГ, ПААГ электрофорез; англ. PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) — метод молекулярной биологии и биохимии, используемый для разделения белков и нуклеиновых кислот, основанный на движении заряженных биологических макромолекул в постоянном электрическом поле. Разделение в полиакриламидном геле происходит за счёт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также от конфигурации молекул. Разделяют неденатурирующий, или нативный ПААГ-электрофорез (при котором разделяемые биологические макромолекулы в процессе электрофореза остаются в нативном состоянии) и денатурирующий ПААГ-электрофорез (при котором пробы предварительно денатурируют, в случае нуклеиновых кислот используют непродолжительное нагревание пробы с формамидом либо глиоксалем, для денатурации белков обычно используют кипячение пробы в буфере, содержащем сильный ионный детергент (обычно додецилсульфат натрия) и агент, разрушающий четвертичную структуру белка за счёт разрушения

дисульфидных мостиков между глобулами белка и внутри полипептидной цепи — бета-меркаптоэтанолом) [53].

Разрешающая способность электрофореза в полиакриламидном геле выше, чем на бумаге.

Особенности электрофореза в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качествами идеального носителя. Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белковых смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля. ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида (создающего линейную «основу») и N, N'-метиленбисакриламида (служащего для поперечных «сшивок» линейных цепей). $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ Акриламид N, N'-метиленбисакриламид. Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50% можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7,5% акриламида, равен 5 нм, а 30% акриламида - 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (Mr) разделяемых веществ и форму их молекул.

Проведение электрофореза

Наиболее часто разделение осуществляется на пластинах, покрытых слоем геля толщиной 2-3 мм. Размеры пластины 10 x 14 см или иное, в зависимости от конструкции прибора. В процессе электрофореза пластина с гелем разогревается в результате протекания через нее тока. Степень разогрева пластины зависит от величины напряжения, при котором происходит разделение. Чем выше напряжение, тем выше сила протекающего по пластине тока и сильнее ее разогревание, поэтому применение высоких напряжений должно сопровождаться охлаждением пластины, чтобы не допускать тепловую денатурацию разделяемых белков. Величина продвижения белков в геле зависит

(в идеале) только от величины наложенного потенциала и времени. При потенциале 500 В разделение может закончиться за 4 часа, а при потенциале 150 В на это потребуется около 14 часов [54].

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Оборудование

1) Фотометр микроплашетный MR-96A (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, China)

Фотометр MR-96A предназначен для измерения оптической плотности проб и образцов биологических жидкостей.

Фотометр состоит из оптико-механического и электронно-вычислительного узлов со встроенным печатающим устройством.

Принцип работы фотометра - фотометрический метод в соответствии с законом Ламберта-Биира. В качестве источника света в приборе используется галогенная лампа. Свет галогенной лампы проходит через интерференционный фильтр и попадает на вход гибкого световода. На выходе световода установлена линза, формирующая параллельный пучок, просвечивающий пробу. Выходная линза световода и фотоприемник установлены на кронштейне, в пазу которого расположен планшет с пробами. Пересечения этих пучков света в ячейке и его регистрация на фотодетекторе позволяет рассчитать часть света, поглощенную образцом. Конечный результат появляется на жидкокристаллическом экране.

2) Мини-камера для вертикального электрофореза VE-10 на два геля размером 8 x 9,5 см

Предназначена для быстрого разделения небольшого количества образцов ДНК или белка. Строение крышки обеспечивает правильную полярность при подключении к источнику питания. Усовершенствованное строение камеры с резьбовыми зажимами, конструкция заливочного устройства и фиксированные на стеклах стеклянные спейсеры позволяют полностью исключить утечку геля (во время заливки) и буфера (при проведении электрофореза).

3) Ламинарный бокс БАВнп-01-«Ламинар-С.»-1.5

Ламинар предназначен для создания беспылевой абактериальной воздушной среды и применяется при оснащении отдельных рабочих мест для работы с агентами и микроорганизмами, не представляющими угрозы для

здоровья оператора, когда необходима защита рабочего материала от окружающей среды или работа с объектом требует стерильной рабочей зоны.

4) Микротермостат М-208

Микротермостат предназначен для термостатирования биопроб в пробирках типа «Eppendorf» объемом 1.5 мл и 0.5 мл. Производитель ООО «НовосибБиоПрибор».

5) Термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ

Термостат предназначен для получения и поддержания внутри рабочей камеры стабильной температуры, необходимой для проведения бактериологических и серологических исследований.

6) Весы электронные CE 2202-C

Весы надежны и просты в эксплуатации, оснащены широким набором прикладных программ и предназначены для измерений массы различных веществ и материалов.

7) Apparat для промывания микропланшет MW-12A (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, P.R. China)

Mindray MW-12A - промыватель для микропланшетов, или вошер, работает в полуавтоматическом программируемом режиме. Прибор включает в себя корпус прибора, программное обеспечение, манипуляторы и жидкостную систему.

Отличается высокой эффективностью и производительностью. Отличительная особенность - малое количество жидкости, остающейся в процессе эксплуатации. Эксплуатируется с 48/96-луночными микропланшетами с тремя типами геометрии дна - конусообразной, плоской и U-образной.

8) Лабораторный pH-метр АНИОН-4100

pH-метр предназначен для ведения физико-химических анализов жидкостей методами: потенциометрии, кондуктометрии и амперометрии.

9) Магнитная мешалка MSH-300

Мешалка предназначена для одновременного перемешивания и нагрева жидкостей разной вязкости.

2.2 Материалы

В работе использовались:

- мерная лабораторная посуда: колбы мерные, конические вместимостью 50 мл, 100 мл, 200 мл, 250 мл, 500 мл; химические стаканы – 50 мл, 150 мл, 250 мл, 500 мл; мерные цилиндры – 10 мл, 25 мл, 50 мл, 100 мл, 250 мл; флаконы пенициллиновые – 10 мл, 20 мл; пробирки «Ependorf» вместимостью 0,5 мл, 1,5 мл;
- средства измерения: дозаторы пипеточные одноканальные «Блэк» номиналом 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл, 1000-10000 мкл; дозатор пипеточный многоканальный «Блэк» 30-300 мкл; дозатор пипеточный электронный многоканальный ДПЭМ-8-100-1200;
- планшеты 96-луночные для ИФА стрипованные, стрипы по 8 лунок, поверхность: MaxiSorp, плоскодонные, PS, производитель «Nunc», Дания;
- планшеты 96-луночные для ИФА стрипованные, плоское дно, без крышки, стрипы по 8 лунок, поверхность PolySorp, производитель «Costar», США.

2.3 Реактивы и биологический материал

- Акриламид (C_3H_5NO), «Sigma-Aldrich»;
- Аммония персульфат ($H_8N_2O_8S_2$), «Sigma-Aldrich»;
- Антивидовые антитела Goat anti rabbit, меченные пероксидазой (конъюгат), «Sigma-Aldrich»;
- Антивидовые антитела Rabbit anti mouse, меченные пероксидазой (конъюгат), «Sigma-Aldrich»;
- Полный адъювант Фрейнда, «Sigma-Aldrich»;
- Неполный адъювант Фрейнда, «Sigma-Aldrich»;

- Бычий сывороточный альбумин (БСА), производитель «Sigma-Aldrich», молекулярная масса ~ 66 kDa, содержание $\geq 98\%$, pH 7;
- Вакцина для профилактики гепатита А культуральная, очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая, ФС.3.3.1.0029.15;
- Глицин ($C_2H_5NO_2$), «Gerbu»;
- Диметилсульфоксид (C_2H_6OS), «PanReac AppliChem»;
- Инактивированная сыворотка мыши, содержащая антитела к ВГА (ГФ XIII);
- Инактивированная сыворотка мыши, не содержащая антитела к ВГА (ГФ XIII);
- Казеин (растворимый в щелочах), «Merck»;
- Калий хлористый (KCl), ГОСТ 4234-77, «Реактив»;
- Каприловая кислота ($C_8H_{16}O_2$), «Serva»;
- Кумасси G-250 ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$), «Диа·м»;
- Лимонная кислота ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), «PanReac AppliChem»;
- Натрия гидроокись (NaOH), ГОСТ 4328-77, «Реактив»;
- Натрий углекислый б/в (Na_2CO_3), ГОСТ 83-79, «Реактив»;
- Натрий углекислый кислый ($NaHCO_3$), ГОСТ 4201-79 (изм.1), «Реактив»;
- Натрий фосфат 2-зам. 12 водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), «PanReac AppliChem»;
- Натрий фосфорнокислый 1-зам. 2-водн. ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), ГОСТ 245-76 (изм.1), «Реактив»;
- Натрий хлористый (NaCl), ГОСТ 4233-77, «Реактив»;
- Антиген ВГА, ГФ XIII;
- Серная кислота (H_2SO_4), ГОСТ 4204-77, «Реактив»;
- Стандарт-титры для приготовления буферных растворов рабочих эталонов pH 4,01; 6,86; 9,18 третьего разряда СТ-pH-04.3, ГОСТ 8.135-2004, «Уралхиминвест»;
- Тетраметилбензидин ($C_{16}H_{20}N_2$), «PanReac AppliChem»;

- Твин 20, «PanReas AppliChem»;
- Уксусная кислота ($C_2H_4O_2$), «PanReas AppliChem»;
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), «Sigma-Aldrich»;
- N, N' -метиленбисакриламид ($C_7H_{10}N_2O_2$), «Sigma-Aldrich»;
- SDS - додецилсульфат натрия ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), «PanReas AppliChem»;
- TEMED - tetramethylethylenediamine ($(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$), «PanReas AppliChem»;
- TRIS ($C_4H_{11}NO_3$), «VWR Life Science AMRESCO».

2.4 Объекты исследования

В качестве объектов исследования представлены:

- иммуноферментные тест-системы с разными схемами иммобилизации антител и антигена на твердой фазе;
- очищенные препараты IgG кролика, IgG мыши;
- сыворотки мышей, вакцинированных по ГФ XIII ФС.3.3.1.0029.15.

2.5 Методы

2.5.1 Получение антигена ВГА

Антиген – Штамм ЛБА-86 вируса гепатита А, наработанный на культуре клеток 4647 и очищенный двойным ультрацентрифугированием в градиенте растворов сахарозы 20%, 15% и 30%, инактивирован раствором формалина согласно нормативной документации: Изм. №1 к Р N000461/01-260918,2019, Альгавак® М.

2.5.2 Иммунизация мышей

Для иммунизации использовались 1,5-2-месячные беспородные белые мыши (30 шт) со средней массой тела $20,0 \pm 1,0$ г. Мыши содержались в стандартных условиях, получая корм и питьевую воду ad libitum.

Для проведения экспериментов мыши проходили карантин, после чего животных взвешивали и распределяли по группам для иммунизации.

В качестве раствора для иммунизации использовали раствор антигена ВГА (штамм ЛБА-86 вируса гепатита А, наработанный на культуре клеток 4647 и очищенный двойным ультрацентрифугированием в градиенте растворов сахарозы) с полным и неполным адьювантом Фрейнда.

Иммунизация проводилась в течение 88 дней. Антиген вводили пятикратно в разные интервалы времени 1, 14, 7, 27, 26 сутки соответственно.

В первые сутки иммунизации каждой мыши вводилось внутримышечно (в/м) в две точки по 0,5 мл раствор антигена ВГА с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ); на 14 и 21 сутки – в/м в две точки по 0,5 мл раствор антигена ВГА с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ); на 35 сутки произведена декапитация одной мыши и забор крови на определение титра антител; на 48 сутки произведена декапитация одной мыши и забор крови на определение титра антител, и, проведена дополнительная иммунизация мышей (28 шт) в/м в две точки по 0,5 мл раствором антигена ВГА с НАФ; на 74 сутки иммунизация мышей проводилась в/б по 0,5 мл раствором антигена ВГА, сорбированном на гидроокиси алюминия, с физ.раствором; на 88 сутки – декапитация мышей (28 шт) и забор крови для исследования на титр антител.

2.5.3 Иммунизация кроликов

При получении специфических и активных сывороток для гипериммунизации применяли очищенный культуральный концентрированный антиген вируса гепатита А с полным и неполным адьювантами Фрейнда.

Гипериммунизации подвергли двух кроликов в возрасте от полугода до года и весом 2,0-2,5 кг.

В первые сутки иммунизации каждому кролику вводили подкожно (п/к) 8-9 точек вдоль позвоночника (в/п) по 1 мл антигена ВГА с 1 мл ПАФ; на 30 сутки – п/к 8-9 в/п по 1 мл антигена с 1 мл НАФ; на 45 сутки иммунизации – в межпальцевое пространство вводили 1 мл антигена ВГА с 1 мл НАФ; на 70 сутки

- в/м 2 точки в бедро 1 мл антиген ВГА с 1 мл НАФ; на 84 сутки - в/м 2 точки в бедро 1 мл антиген ВГА с 1 мл НАФ. На 98 сутки проводят забор крови для исследования на титр антител.

2.5.4 Метод очистки препаратов иммуноглобулинов (IgG) животных каприловой кислотой с последующим высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония

Иммунную и неиммунную сыворотку крови мышей или кроликов разводили в пробирке 4 объемами 0,6 М ацетатного буфера (состав: 0,004 М лимонной кислоты; 0,2 М натрия ацетата, pH 4,0) и доводили pH до 4,5 с помощью 0,1 N раствора едкого натра. К разведенному образцу добавляли каприловую кислоту (из расчета 25 мкл на 1 мл раствора) и пробирку помещали на электрическую качалку для постоянного перемешивания содержимого в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали 30 мин при 10000 об/мин, осадок удаляли, а к фильтрованному надосадку добавляли равный объем холодного раствора насыщенного сульфата аммония и выдерживали сутки при +2-8°C для концентрирования IgG. Раствор центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин. Надосадок аккуратно сливали, а осадок растворяли в растворе объема первоначального объема сыворотки крови в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,5±0,3) с 50% раствором насыщенного сульфата аммония.

2.5.5 Метод дополнительной очистки препаратов иммуноглобулинов (IgG) кроликов с использованием аффинной хроматографии

Дополнительная очистка IgG кролика состояла из следующих этапов:

1. Диализ против 0,1М трис-HCl буфера, pH 8,0 (0,02М К-фосфатный буфер, 0,15М NaCl, 0,02% азид натрия, pH 7,3).
2. Аффинная хроматография на белок А иммуносорбенте.
3. Концентрирование ультрафильтрацией.
4. Диализ против ЗФР.

2.5.6 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-SDS)

Растворы

а) Разрешающий гель: 30% акриламида; 1,5 М Tris (pH 8,8); 10% SDS; 10% аммония персульфата; TEMED 1 мкл/мл.

После добавления TEMED, полученный раствор быстро, но аккуратно, встряхивают (для перемешивания и без образования пузырей), сразу заливают между стеклами с помощью автоматической пипетки и помещают широкую гребенку (один большой карман). После полимеризации геля, гребенку вытаскивают, а карман промывают дистиллированной водой. Готовят концентрирующий гель.

б) Концентрирующий гель: 30% акриламида; 1М Tris (pH 6,8); 10% SDS; 10% аммония персульфата; TEMED 1 мкл/мл.

Перед добавлением TEMED, из кармана геля удаляют воду и промакивают фильтровальной бумагой. После добавления TEMED, концентрирующий гель аккуратно встряхивают (без образования пузырей), быстро заливают в большой карман, приготовленный из разрешающего геля и сразу помещают гребенку с отдельными карманами.

Встряхивают и быстро заливают. Сразу между стеклами помещают гребенку.

в) Буферные растворы:

- *верхний* (5X трис-глициновый буферный раствор, pH 8,3): 1,25 мМ Tris; 1,25 М глицина; 0,5% SDS;

- *нижний* (1X трис-ацетатный буферный раствор, pH 8,0): 40 мМ Tris- HCl; 40 мМ уксусной кислоты; 2 мМ EDTA.

Оборудование

1. Мини-камера для вертикального электрофореза VE-10.
2. Комплект оборудования для формирования геля: стекла с приклеенными спейсерами, две гребенки, скальпель, ножницы.

3. Химические колбы, стаканы, пластиковые пробирки на 50 мл, автоматические пипетки-дозаторы регулируемого объема, одноразовые шприцы на 20 мл.

4. pH-метр.

5. Хроматографическая или фильтровальная бумага - 0,5 листа.

6. Холодильная камера.

Метод

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ) проводили в разрешающем геле и концентрирующем геле в различных буферных растворах (верхний - 5X трис-глициновый буферный раствор pH 8,3, нижний - 1X трис-ацетатный буферный раствор pH 8,0. Биологический материал смешивали с буферным раствором для нанесения, кипятили 5 минут и наносили в верхний концентрирующий гель. SDS-ПААГ вели при напряжении ~ 10 В/см в концентрирующем геле, ~ 180 В в разрешающем геле. Окраску гелей проводили при помощи раствора Кумасси G-250

Электрофорез проводили по методу, предложенному А.А. Остерманом в 1981 г. [55].

2.5.7 Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА)

Растворы

1) *Буферные растворы для сорбции антигена или антител на полистироловые планшеты:*

а) *карбонатный буферный раствор КБР (pH $9,6 \pm 0,1$):* 35 мМ натрия углекислого кислого; 15 мМ натрия углекислого безводного;

б) *фосфатно-солевой буферный раствор ФСБ (pH $7,5 \pm 0,3$):* 1 часть 10-кратного концентрата фосфатно-солевого буфера (ФСБх10), «Химмед» и 9 частей дистиллированной воды.

2) *Раствор для блокировки:* 1% казеина на ФСБ-Тх1 (pH $7,5 \pm 0,3$).

3) *Раствор для отмывки:* 1 часть 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буфера с твином (ФСБ-Тх25), «Химмед» и 24 части дистиллированной воды.

4) *Раствор для разведения антител при постановке ИФА:* 0,5% казеин на ФСБ-Тх1 (рН $7,5 \pm 0,3$).

5) *Раствор для разведения конъюгата:* 0,5% казеин на ФСБ-Тх1 (рН $7,5 \pm 0,3$).

6) *Субстрат: раствор ТМБ с ЦФР*

ТМБ: на 50мл - 1 мМ тетраметилбензидина, 0,5М диметилсульфоксида, 2М дистиллированной воды;

ЦФР: 0,08М натрий фосфат 2-зам. 12 водный, 0,02М лимонной кислоты, 0,02М калия гидроокиси, 3мМ перекиси водорода.

7) *Стоп-реагент:* раствор серной кислоты 2 моль/л.

А) Процедура проведения непрямого ТИФА I

1. На поверхность лунок планшета сорбируется антиген ВГА с использованием разных буферных растворов: карбонатного, рН $9,6 \pm 0,1$; фосфатного, рН $7,5 \pm 0,3$.

Время сорбции 18-20 часов при $+18-25^{\circ}\text{C}$ или при $+2-8^{\circ}\text{C}$.

2. Отмывка (3-х кратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется раствором ФСБ-Тх1.

3. Блокировка мест неспецифического связывания на лунках планшета 1%-ным раствором казеина, приготовленным на ФСБ-Тх1.

Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

4. Стряхивание блокировочного раствора и подсушка при комнатной температуре (при закладке на хранение при $+2-8^{\circ}\text{C}$).

5. Растворка специфичных антител (при необходимости подобрать оптимальную концентрацию антител или определить титр). Если оптимальная концентрация и/или титр антител определены, то использовать рекомендованное для данных конкретных антител разведение.

Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

6. 3-х кратная отмывка лунок планшетов раствором ФСБ-Тх1.

7. Внесение антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

8. 3-х кратная отмывка лунок планшетов раствором ФСБ-Тх1.

9. Проявка иммунной реакции раствором ТМБ в течение 10-20 минут при комнатной температуре в темном от света месте.

10. Остановка реакции раствором серной кислоты 2 моль/л.

11. Учет результатов на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Б) Процедура проведения непрямого «сэндвич» ТИФА II

1. На поверхность лунок планшета сорбируются очищенные IgG иммунизированного кролика с использованием разных буферных растворов: карбонатного, pH $9,6 \pm 0,1$; фосфатного, pH $7,5 \pm 0,3$.

Время сорбции 18-20 часов при $+2-8^{\circ}\text{C}$ или 4 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

2. Отмывка (3-х кратная) несвязавшихся молекул антител осуществляется раствором ФСБ-Тх1.

3. Блокировка мест неспецифического связывания на лунках планшета 1%-ным раствором казеина, приготовленным на ФСБ-Тх1.

Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

4. Стряхивание блокировочного раствора.

5. Сорбция антигена ВГА с раствором 1% казеина.

Время сорбции 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

6. 3-х кратная отмывка лунок планшетов раствором ФСБ-Тх1.

7. Раститровка специфичных антител (при необходимости подобрать оптимальную концентрацию антител или определить титр). Если оптимальная концентрация и/или титр антител определены, то использовать рекомендованное для данных конкретных антител разведение.

Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

8. 3-х кратная отмывка лунок планшетов раствором ФСБ-Тх1.
9. Внесение антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.
Время инкубации 1,5 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.
10. 3-х кратная отмывка лунок планшетов раствором ФСБ-Тх1.
11. Проявка иммунной реакции раствором ТМБ в течение 10-20 минут при комнатной температуре в темном от света месте.
12. Остановка реакции раствором серной кислоты 2 моль/л.
13. Учет результатов на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1 Предпроектный анализ

Общая характеристика НИР

Научно-исследовательская работа посвящена разработке иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А (ВГА) на мышах. Перед нами стояла задача разработки тест-системы, при производстве которой будет использоваться наименьшее количество биоматериала (в связи с его дороговизной), при условии, что тест-система будет соответствовать всем требованиям ГФ XIII при испытании вакцины на иммуногенность.

Потенциальные потребители результатов исследований

Основным потребителем разработанной тест-системы будет АО «Вектор-БиАльгам» для внутрипроизводственного контроля качества вакцины против вируса гепатита А «АЛЬГАВАК®М».

Потенциальными потребителями также могут быть другие фармацевтические компании по производству вакцины против вирусного гепатита А.

4.2 Диаграмма Исикавы

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) – это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструментальное средство для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления.

Объектами анализа в проводимой исследовательской работе являются иммуноферментные тест-системы с разными схемами иммобилизации антител и антигена на твердой фазе, а также отработка условий проведения лабораторных ИФА в двух форматах. Причинно-следственная диаграмма представлена на рисунке 4.1.

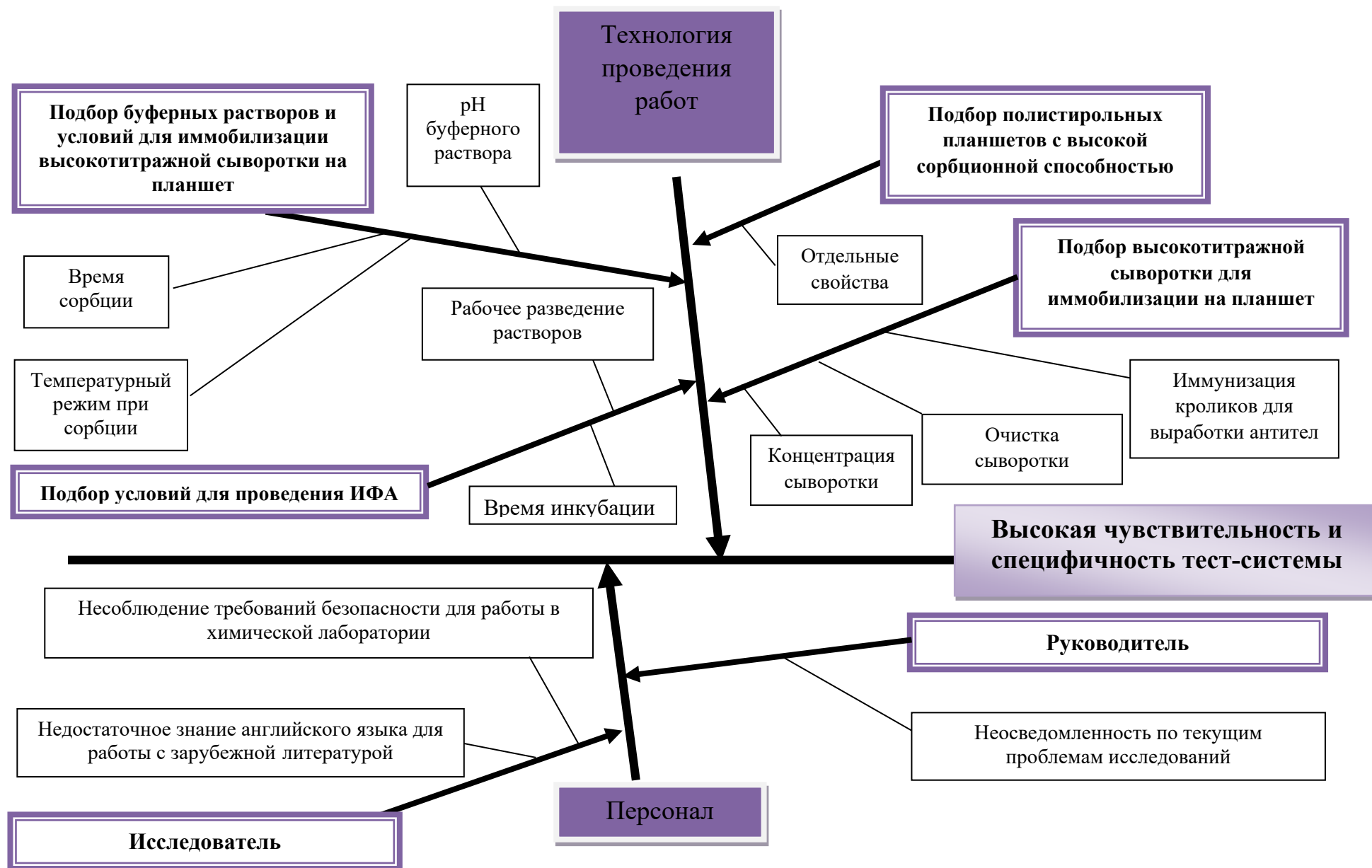


Рисунок 4.1 – Причинно-следственная диаграмма Исикавы

4.3 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существуют различные методы коммерциализации научных разработок. На данной стадии представленной научной разработки успешному продвижению способствует торговля патентными лицензиями, с помощью которой будет достигнута передача третьим лицам интеллектуальной собственности на лицензионной основе.

4.4 Инициация проекта

Таблица 4.1 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Разработка иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А
Ожидаемые результаты проекта:	Создание высокочувствительной иммуноферментной тест-системы для определения антител к вирусу гепатита А у иммунизированных мышей дозой вакцины, способной вызвать образование антител у 50% мышей
Критерии приемки результата проекта:	Не использование вредных реактивов; уменьшение количества биоматериала при производстве тест-системы в целях экономии; получение высокочувствительной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против ВГА, соответствующей требованиям ГФ XIII

Таблица 4.2 - Рабочая группа проекта

№, п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
1	Дорожка Елена Владимировна, к.х.н., доцент отделения химической инженерии	Руководитель проекта	Координирует деятельность участников проекта	60
2	Маланина Вероника Анатольевна доцент ОСГН, к.э.н.	Эксперт проекта	Координирует деятельность магистранта при выполнении раздела «Финансовый менеджмент»	2
3	Скачкова Лариса Александровна,	Эксперт проекта	Координирует деятельность	2

	старший преподаватель ООД ШБИП		магистранта при выполнении раздела «Социальная ответственность»	
4	Терре Дина Анатольевна, Доцент ОИЯ, к.ф.н	Эксперт проекта	Консультирует по разделу на иностранном языке	2
5	Крупницкая Юлия, магистрант	Исполнитель	Выполнение работ по проекту	420
Итого				486

Таблица 4.3 - Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/допущения
Бюджет проекта	
Источник финансирования	АО «Вектор-БиАльгам», НИ ТПУ
Сроки проекта	
Дата утверждения плана управления проектом	01.06.2019
Дата завершения проекта	31.05.2020

4.5 Планирование управления научно-техническим проектом

Организационная структура проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 4.2 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.

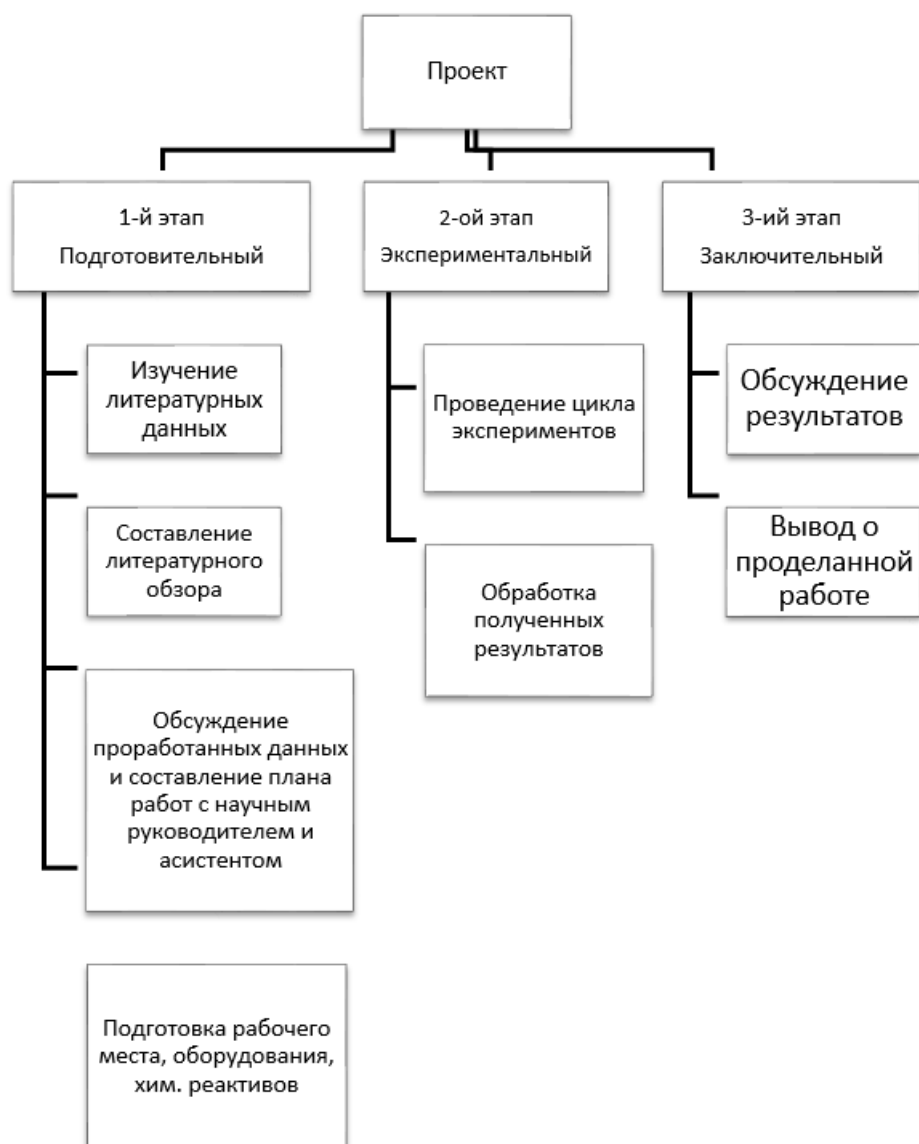


Рисунок 4.2 – Иерархическая структура работ проекта

План проекта

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

Таблица 4.4 - Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Получение задания и составления плана работ	6	15.01.20	20.01.20	Дорожко Е.В. Крупницкая Ю.А.
2	Подбор и изучение теоретических материалов	19	21.01.20	08.02.20	Крупницкая Ю.А.
3	Поиск методик и характеристика объектов исследования	10	09.02.20	18.02.20	Крупницкая Ю.А.
4	Проведение экспериментов	42	19.02.20	01.04.20	Крупницкая Ю.А.
5	Обработка и обсуждение результатов	14	02.04.20	15.04.20	Дорожко Е.В. Крупницкая Ю.А.
6	Оформление проекта	28	16.04.20	13.05.20	Крупницкая Ю.А.
7	Разработка презентации и раздаточного материала	18	14.05.20	31.05.20	Крупницкая Ю.А.

Таблица 4.5 - Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Вид работ	Исполнители	Т _к , кал, дн	Продолжительность выполнения работ														
			январь		февраль			март			апрель			май			
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Получение задания и составления плана работ	Руководитель Магистрант	6															
Подбор и изучение теоретических материалов	Магистрант	19															
Поиск методик и характеристика объектов исследования	Магистрант	10															

Таблица 4.6 – Расчет затрат на сырье

п/п	Наименование затрат	Единица измерений	Расход	Цена за единицу, руб (с НДС)	Сумма, руб
1	IgG фракция антисыворотки против гепатита А (1 фл-19,6мл)	мл	1,08	427,30	461,48
2	Адьювант Фрейнда неполный, 10 мл	флак	0,27	4803,34	1296,9
3	Адьювант Фрейнда полный, 10 мл	флак	0,135	1430,85	193,16
4	Гидроокись натрия ЧДА	кг	0,014	140,00	1,96
5	Диметилсульфоксид	л	0,0216	3348,31	72,32
6	Казеин	кг	0,00675	6652,54	44,90
7	Кислота лимонная ЧДА	кг	0,0135	300,00	4,05
8	Конъюгат IgG фракции антисыворотки с пероксидазой хрена (1 проб-10мг-1,7мл)	мл	0,216	4926,47	1064,12
9	Кумасси-Бриллиантовый голубой	г	0,054	73,19	3,95
10	Натрий углекислый кислый	кг	0,027	290,00	7,83
11	Натрий фосфат 1-замещ. 2-водный	кг	0,014	270,00	3,78
12	Натрий фосфат 2-замещ. 12-водный	кг	0,108	2360,17	254,90
13	Натрий хлористый	кг	0,243	65,00	15,80
14	Перекись водорода	кг	0,297	115,00	34,16
	Сыворотка кролика, содержащая антитела к вирусу гепатита А, 1мл	фл	1,00	5700,00	5700,00
15	Твин 20	л	0,015	13823,72	207,36
16	Тетраметилбензидин	г	0,234	2280,00	533,52
17	Феноловый красный	кг	0,000027	16000,00	0,43
18	Ванночка д/разведения реагентов	шт	59,0	2,12	125,08
19	Планшет разборный д/исследований	шт	40,0	85,84	3433,6
20	Пробирка микроцентриф. 1,5мл	шт	30,0	1,75	52,5
21	Пробирка микроцентриф. 0,5мл	шт	45,0	3,08	138,6
22	Стандарт-титр для рН-метрии	амп	3,0	68,33	204,99
23	Наконечник 100-1000мкл	шт	100,0	8,20	820,00
24	Наконечник до 200 мкл	шт	250,0	0,94	235,00
25	Наконечник до 5 мл	шт	50,0	20,45	1022,50
26	Колбы мерные 50мл	шт	3,0	115,00	345,00
27	Колба мерная 100 мл	шт	3,0	120,00	360,00

28	Стакан хим.100 мл	шт	3,0	50,00	150,00
29	Стакан хим.50 мл	шт	3,0	45,00	135,00
30	Стакан хим.250 мл	шт	3,0	75,00	225,00
31	Цилиндр 25 мл	шт	2,0	105,00	210,00
32	Цилиндр 50 мл	шт	2,0	120,00	240,00
33	Цилиндр 100 мл	шт	2,0	155,00	310,00
Итого					17907,39

Специальное оборудование для научных работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования, необходимого для проведения экспериментальных работ. Определение стоимости спецоборудования проводили по действующим прейскурантам с учетом НДС. Затраты по доставке и монтажу заложены в цену оборудования.

В таблице 4.7 представлены затраты на специальное оборудование, необходимое для проведения научных исследований.

Таблица 4.7 – Расчет затрат по статье «Специальное оборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб
1	Центрифуга с ротором для микропробирок	1	11862,44
2	Термостат эл.суховозд. ТС-1/80	1	14333,36
3	Мешалка магнитная с подогревом MSH-300	1	22543,5
4	pH метр АНИОН 4100	1	16855,93
5	Дозатор пипеточный 1-10 мл	1	9788,00
6	Дозатор пипеточный 8-30-300 мкл	1	21110,00
7	Дозатор пипеточный 0,5-5 мл	1	8780,17
8	Дозатор пипеточный 2-20 мкл	1	8780,17
9	Дозатор пипеточный 10-100 мкл	1	8780,17
Итого			122833,74

Стоимость оборудования, используемого при выполнении НИР имеющегося на фармацевтическом производстве АО «Вектор-БиАльгам», стоимостью свыше 40 тыс. рублей, учитывалось в виде амортизационных отчислений.

Амортизационные отчисления рассчитываются по следующей формуле:

$$A = (C / \text{СПИ}) \cdot 5 \text{ мес.} \quad (4.1)$$

где A – сумма амортизации за период научной работы (5 месяцев);

C — первоначальная стоимость объекта оборудования;

СПИ – срок полезного использования объекта оборудования, в месяцах.

Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования» представлена в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

№ п/п	Наименования оборудования	Цена единицы оборудования, тыс. руб.	Срок эксплуатации оборудования, мес	СПИ, мес	Амортизационные отчисления, руб.
1	Фотометр микропланшетный MR-96A	175000	5	72	12152,78
2	Весы электронные CE 2202-C	71750	5	48	7473,96
3	Аппарат для промывания микропланшет MW- 12A	183312	5	36	25460,00
4	Ламинарный бокс БАВнп-01- «Ламинар-С.»-1,5	265000	5	72	18402,78
Итого					63489,52

Основная заработная плата исполнителей темы

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда.

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{\text{зп}} = Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}, \quad (4.2)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата;

$Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (4.3)$$

где $Z_{\text{осн}}$ - основная заработная плата одного работника;

$T_{\text{р}}$ - продолжительность работ, выполняемых научно–техническим работником, раб. дн. (табл. 4.8);

$Z_{\text{дн}}$ - среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (4.4)$$

где $Z_{\text{м}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года;

$F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно–технического персонала, раб. дн.

Таблица 4.9 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистрант
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней - выходные - праздничные дни	118	118
Потери рабочего времени - отпуск - невыходы по болезни	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	247	247

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{б}} \cdot k_{\text{р}}, \quad (4.5)$$

где $Z_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска)

Основная заработная плата руководителя (от ТПУ) рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Отраслевая система оплаты труда в ТПУ предполагает следующий состав заработной платы:

- 1) Оклад – определяется предприятием. В ТПУ оклады распределены в соответствии с занимаемыми должностями. Базовый оклад Z_6 определяется исходя из размеров окладов, определенных штатным расписанием предприятия.
- 2) Стимулирующие выплаты – устанавливаются руководителем подразделений за эффективный труд, выполнение дополнительных обязанностей и т.д.
- 3) Иные выплаты; районный коэффициент.

Найдем основную заработную плату за период с января по май 2020 года для руководителя:

$$Z_{5\text{мес}} = 35120,00 \cdot 5 = 140480,00 \text{ руб.}$$

$$Z_{\text{осн}} = 140480,00 \cdot 1,3 = 182624,00 \text{ руб.}$$

Основная заработная плата за период с января по май 2020 года для магистранта:

$$Z_{5\text{мес}} = 19200,00 \cdot 5 = 96000,00 \text{ руб.}$$

$$Z_{\text{осн}} = 96000,00 \cdot 1,3 = 124800,00 \text{ руб.}$$

Таблица 4.10 - Расчет основной заработной платы с января по май 2020г.

Исполнители	Z_6 , руб.	k_p	$Z_{5\text{мес}}$, руб	$Z_{\text{осн}}$, руб.
Руководитель	35120,00	1,3	175600,00	228280,00
Магистрант	19200,00	1,3	96000,00	124800,00
Итого				353080,00

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}}) \quad (4.6)$$

где $K_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (30,2% от статьи заработной платы).

$$C_{\text{внеб}} = 0,302 \cdot 353080,00 = 106630,16 \text{ руб.}$$

Отчисления на социальные нужды составили 106630,16 рубля.

Затраты на проведение НИР

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НИР. Смета затрат приведена в таблице 4.11.

Таблица 4.11 – Смета затрат на выполнение НИР

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	17907,39
Специальное оборудование	122833,74
Амортизация	63489,52
Основная заработная плата	353080,00
Отчисление на социальные нужды	106630,16
Плановая себестоимость	663940,81

Глава 5 Социальная ответственность

В настоящем разделе рассматриваются вопросы охраны труда, связанные с работой в лаборатории, а также описаны мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создание безопасных условий труда для обслуживающего персонала. Научно-исследовательская работа по разработке иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А на мышах выполнялась с использованием электрооборудования и применением химических веществ в лабораторном помещении.

В Федеральном законе РФ от 28 декабря 2013 г. N 426-ФЗ "О специальной оценке условий труда" Статья 3. Специальная оценка условий труда говорится, что необходимо выявить все вредные и опасные факторы для оценки их влияния на работника. Выполнение научно-исследовательской работы по данной тематике требует четкого соблюдения правил по технике безопасности и охраны труда работников: при работе с химическими реактивами; потенциально инфицированным материалом; при работе с электрооборудованием и т.п.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

5.1.1 Правовые нормы трудового законодательства

Любые отношения, связанные с использованием труда сотрудника, регулируются соответствующими нормативно-правовыми актами, представляющие собой нормы трудового права.

Согласно ТК РФ, N 197 –ФЗ [56] каждый работник имеет право на:

- рабочее место, соответствующее требованиям охраны труда;
- обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний;
- обеспечение средствами индивидуальной и коллективной защиты;
- обучение безопасным методам и приемам труда;
- внеочередной медицинский осмотр;

- повышенные или дополнительные гарантии и компенсации, если сотрудник занят на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Производство вакцины против гепатита А «АЛЬГАВАК® М» соответствует международному стандарту GMP [57]. Стандарты GMP (Good Manufacturing Practice) предназначены для построения системы качества на предприятиях фармацевтической отрасли.

Принципы GMP требуют наличия достаточного числа комнат или зон для обеспечения изоляции тест-систем и пригодности подобных зон для обеспечения минимизации вероятности загрязнения тест-систем. Целостность каждой тест-системы и исследования не должны быть поставлены под угрозу из-за возможности потенциального или перекрестного загрязнения, или смешивания.

При проведении исследований, необходимо обеспечивать проведение работы в асептических условиях, защищая тест-системы и исследования путем минимизации вероятности загрязнения в ходе подготовки тестируемых и стандартных объектов (образцов).

Помещения лаборатории должны быть боксированными (боксы с предбоксами) и оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, водопроводом, канализацией, электричеством и отоплением, средствами пожаротушения, естественным и искусственным освещением.

Температура воздуха в лабораторных помещениях должна поддерживаться в пределах 18-21°C.

Внутреннюю отделку помещений осуществляют кафелем (пол, стены) или краской (стены, потолок), устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих средств.

В помещениях рабочих зон должны быть установлены бактерицидные лампы в соответствии с Р 3.5.1904-04 [58].

Окна должны быть плотно закрыты, возможно использование светозащитных пленок из материала, устойчивого к действию используемых

дезинфицирующих средств. Использование жалюзи запрещено.

Архитектурно-планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения исследуемого материала.

В состав лаборатории могут быть включены вспомогательные помещения (комнаты персонала, кабинет заведующего лабораторией, раздевалки для сотрудников, комната приема пищи, туалет, подсобные (складские) помещения), которые должны быть вынесены за пределы рабочей зоны.

Необходимо предусмотреть наличие автоклавной комнаты для обеззараживания исследуемого материала.

Лабораторная мебель, поверхность используемого оборудования должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих средств, ультрафиолетового излучения.

Оборудование и измерительные приборы, используемые в работе лаборатории, должны быть зарегистрированы в установленном порядке и исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации, соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости [57].

Лаборатория должна быть обеспечена аптечкой стандартной комплектации для оказания первой медицинской помощи при авариях.

Работающие должны быть обеспечены средствами индивидуальной защиты по нормам и в установленные сроки в соответствии с Постановлением от 16 декабря 1997 года N 63 [59] и ГОСТ 12.4.011-89 [60]. При выборе средств индивидуальной защиты должен учитываться весь комплекс вредных факторов производственной среды.

Рабочие и служащие, занятые на работе с вредными или опасными условиями труда, проходят обязательные медицинские осмотры.

В каждом рабочем помещении должны быть в наличии огнетушители и песок, а в помещениях с огнеопасными и легковоспламеняющимися веществами - дополнительные средства пожаротушения.

Все помещения лаборатории должны соответствовать требованиям

электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-2017 [61].

5.2 Производственная безопасность

Для работы в химической лаборатории требуется соблюдение техники безопасности и охраны труда, использование средств индивидуальной защиты, для обеспечения максимально безвредных условий труда.

Неблагоприятные факторы производственной среды могут воздействовать на работников в случае нарушения санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории. К таким факторам можно отнести, например, отклонение показателей микроклимата в помещении; недостаточная освещенность рабочей зоны; потенциально инфекционный материал; токсические, раздражающие факторы, возникающие при работе с химическими реактивами. В таблице 5.1 представлен анализ вредных и опасных факторов при разработке иммуноферментной тест-системы для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А на мышах.

Таблица 5.1. – Возможные опасные и вредные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативные документы
	Разработка	Изготовление	Эксплуатация	
1.Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений
2. Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+	+	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03 «Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий» ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация
3. Поражение электрическим током при нарушении правил	+	+	+	ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ).

эксплуатации электрооборудования				Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
4. Заражение при работе с потенциально инфекционным материалом	+	+	+	ГОСТ Р 51609 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»
5. Нарушение правил эксплуатации бактерицидных ламп	+	+	+	Р 3.5.1904-04 Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях МУ 42-51-8-93 Применение бактерицидных ламп
6. Нарушение техники безопасности при работе с химическими веществами	+	+	+	ГОСТ Р 55064-2012 Натр едкий технический. ТУ ГОСТ 4204-77 Реактивы. Кислота серная. ТУ ГОСТ 24363-80 Реактивы. Калия гидроокись. ТУ

Отклонение показателей микроклимата

Микроклимат характеризуется особыми нормами. Параметры микроклимата в помещении:

- температурный режим атмосферы;
- скорость передвижения воздушного пространства;
- влажность воздуха;
- химический состав воздушной среды.

Неудовлетворительное состояние микроклимата в помещении вызывает не только дискомфорт у человека, а еще и чревато различными заболеваниями. Например, слишком низкая температура в помещении при длительном нахождении вызывает простудные заболевания, а слишком высокая неблагоприятно сказывается на сердечно-сосудистой системе.

Чрезмерно сухой воздух приводит к снижению работоспособности, нарушению водного баланса организма, сухости слизевых оболочек, а как следствие организм становится более уязвим к инфекциям.

Нарушение водного баланса неблагоприятно сказывается на всем организме, кроме того влияет так же на внешний вид кожи, она становится

стянутой и начинает шелушиться. Слишком влажный воздух тоже плох для здоровья. Сырость повышает риск заболеваний дыхательных путей.

Оптимальные и допустимые значения характеристик микроклимата устанавливаются в соответствии с СанПиН 2.2.4.548-96 [62] и приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Оптимальные и допустимые параметры микроклимата

Период года	Категория работ	Температура, °С	Относительная влажность, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный и переходный	Ia	22–24	40-60	0,1
Тёплый	Ia	23–25	40-60	0,1

Мероприятия по нормализации состояния воздушной среды производственных помещений:

- для нормализации температурно-влажностного режима применяют системы вентиляции, отопления и кондиционирования воздуха;
- механизация и автоматизация производственных процессов, использование более совершенных машин и оборудования;
- теплоизоляция нагреваемых поверхностей оборудования и установка защитных экранов;
- организация рационального питьевого режима с целью компенсации потерь организмом влаги и солей;
- использование средств индивидуальной защиты работающих, с целью предотвращения перегрева или переохлаждения организма;
- для профилактики отрицательного влияния дискомфортных условий труда важно спланировать рациональное чередование периодов труда и отдыха и медицинские осмотры.

Недостаточная освещенность рабочей зоны

Свет является одним из важнейших условий существования человека.

Согласно СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03 [63] недостаточная освещенность

рабочей зоны является вредным производственным фактором, который может вызвать ослепленность или привести к быстрому утомлению и снижению работоспособности.

Свет влияет на физиологическое состояние человека, правильно организованное освещение стимулирует протекание процессов высшей нервной деятельности и повышает работоспособность. При недостаточном освещении человек работает менее продуктивно, быстро устает, растет вероятность ошибочных действий, что может привести к травматизму.

Согласно ГОСТ 12.4.011-89 [64] к средствам нормализации освещенности производственных помещений рабочих мест относятся:

- источники света;
- осветительные приборы;
- световые проемы;
- светозащитные устройства;
- светофильтры;
- защитные очки.

Поражение электрическим током

Причинами несчастных случаев могут явиться: работа с неисправными электроприборами, прикосновение к металлическим предметам и корпусам приборов, случайно оказавшимся под током, контакт с находящимся под током плохо изолированным или совсем не изолированным проводом.

Во избежание травм и несчастных случаев при работе с приборами, находящимися под током, и их включении в сеть необходимо соблюдать определенные правила.

Запрещается использовать для подключения электроприборов провода с поврежденной изоляцией или вообще без изоляции, а также провода, не снабженные штекерами или припаянными клеммами. Запрещается вскрывать электрощитки и магнитные пускатели, находящиеся на лабораторных столах. В

лабораториях разрешается использовать электроприборы только заводского производства. Приборы должны содержаться в чистоте [65].

Основные правила поведения в ситуации, когда произошло воздействие тока на человека:

1. При оказании первой помощи необходимо выполнить два этапа действий – освободить потерпевшего от воздействия электротока и провести манипуляции в рамках доврачебной помощи.

2. Первая помощь должна оказываться оперативно, т.е. немедленно и при допустимости в месте произошедших событий. Максимальная эффективность обеспечивается при условии, что манипуляции произведены в пределах 4 мин. после остановки сердца. Если промедлить, то вероятность летального исхода возрастает многократно.

3. Коварство поражения электротоком состоит в том, что оно часто вызывает клиническую смерть. Поэтому нельзя отказываться от проведения доврачебных манипуляций, даже если вы думаете, что потерпевший умер, у него нет пульса, дыхания, сердцебиения. Первая помощь оказывается во всех случаях повреждения организма. Вывод о летальном исходе делается только медиком.

4. Потерпевший не должен после контакта с током передвигаться или продолжать трудовую деятельность. Ухудшение состояния может произойти не сразу, а через некоторое время.

Вне зависимости от состояния, необходимо в обязательном порядке вызвать бригаду медиков.

Заражение при работе с потенциально инфекционным материалом

Потенциально инфицированный материал - материал, в отношении которого нельзя дать гарантии отсутствия возбудителей инфекционных заболеваний.

По квалификации в зависимости от потенциального риска применения иммуноферментная тест-система для анализа иммуногенности вакцины против вирусного гепатита А относится к классу 2а [66].

При постановке иммуноферментного анализа следует соблюдать меры, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом согласно [67]:

- надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, одноразовые медицинские маски.

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать согласно [68].

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие гуанидиновые соли, активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов.

Нарушение правил эксплуатации бактерицидных ламп

Бактерицидная лампа - электрическая ртутная газоразрядная лампа низкого давления с колбой из увиолевого стекла или другого материала, обеспечивающего заданный спектр пропускания ультрафиолетового излучения.

Применение и техника безопасности открытых бактерицидных ламп

На персонал, работающий с облучателем, воздействуют следующие вредные и опасные производственные факторы:

- УФ-излучение;
- озон;
- пары ртути (при нарушении целостности бактерицидных ламп).

Бактерицидные лампы применяются в отсутствие людей в перерывах между работой, ночью или в специально отведенное время - до начала работы на 1 - 2 часа.

Выключатели для открытых ламп следует размещать перед входом в производственное помещение и оборудовать сигнальной надписью: «Горят бактерицидные лампы» или «Не входить, включен бактерицидный облучатель». Нахождение людей в помещениях, в которых работают неэкранированные лампы, ЗАПРЕЩАЕТСЯ.

Вход в помещение разрешается только после отключения неэкранированной бактерицидной лампы, а длительное пребывание в указанном помещении - только через 15 минут после отключения.

Содержание озона в воздушной среде помещения с бактерицидными облучателями не должно превышать 0,03 мг/м, содержание паров ртути в помещении не должно превышать 0,0003 мг/м.

Персонал, выполняющий обеззараживание с помощью облучателя, должен быть обеспечен защищающими глаза и кожу от УФ-излучения: спецодеждой, лицевой маской, очками со светофильтрами, перчатками.

При любых неисправностях прибора и любой ситуации, представляющей угрозу для окружающих, персонал обязан немедленно сообщить об этом руководителю отделения [58].

В случае обнаружения характерного запаха озона необходимо:

- немедленно отключить питание облучателя от сети;
- включить вентиляцию или открыть окно для тщательного проветривания до исчезновения запаха озона;
- включить облучатели и через 1 ч непрерывной работы (при закрытых окнах и включенной вентиляции) провести замер концентрации озона или проконтролировать наличие запаха;
- при превышении предельно допустимой концентрации или наличии стойкого запаха озона прекратить эксплуатацию облучателя и заменить лампы.

Соблюдать осторожность и не допускать механических повреждений колбы при установке или замене ламп.

В бактерицидных лампах содержится ртуть. В случае разбития лампы обработать место утечки ртути 1% раствором марганцовокислого калия [69].

Нарушение техники безопасности при работе с химическими веществами

Данная работа связана с использованием вредных и опасных химических реактивов. При несоблюдении мер безопасности они могут причинить вред здоровью и угрозу жизни.

1) Едкий натр (NaOH)

Едкий натр представляет собой едкое коррозионноактивное вещество. При попадании на кожу вызывает химические ожоги, а при длительном воздействии может вызывать язвы и экземы. Сильно действует на слизистые оболочки. Опасно попадание едкого натра в глаза. Каустик запрещается брать голыми руками. При продолжительном действии он вызывает серьезное отравление. В качестве противоядия можно использовать растворы слабых кислот. Работая с растворами едкой щелочи, надо надевать защитные очки. Если все же брызги раствора попадут в глаза, их сразу же нужно промыть водой. Предельно допустимая концентрация аэрозоля едкого натра в воздухе рабочей зоны производственных помещений (ПДК) - 0,5 мг/м³. При работе с натром едким, необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты: защитными очками, резиновыми перчатками и защитной одеждой. Каустическая сода пожаро- и взрывобезопасна, относится к вредным веществам 2-го класса опасности по ГОСТ 12.1.007 [70].

2) Серная кислота (H_2SO_4)

Серная кислота и ее пары обладают сильным прижигающим и раздражающим слизистые оболочки действием.

При попадании на кожу и слизистые оболочки серная кислота вызывает тяжелые ожоги.

При работе с препаратом необходимо строго соблюдать меры, предупреждающие выделение серного ангидрида в воздух, попадание серной кислоты на кожу, применять индивидуальные средства защиты (халаты с длинными рукавами по ГОСТ 12.4.131-83 [71], респираторы, защитные очки, резиновые перчатки, нарукавники, резиновые фартуки), а также соблюдать меры личной гигиены.

Предельно допустимая концентрация серной кислоты и серного ангидрида в воздухе рабочей зоны производственных помещений - 1 мг/м ГОСТ 4204-77 [72]. При превышении ПДК пары серной кислоты раздражают и прижигают слизистые оболочки верхних дыхательных путей, поражают легкие. Класс опасности 2 по ГОСТ 12.1.005-88 [73].

Помещения, в которых проводятся работы с серной кислотой, должны быть оборудованы общей приточно-вытяжной механической вентиляцией. Анализ препарата необходимо проводить в вытяжном шкафу лаборатории [74].

3) *Гидроокись калия (KOH)*

Гидроокись калия в виде раствора и пыли действует прижигающе на кожные покровы и слизистые оболочки.

Предельно допустимая концентрация аэрозоля гидроокиси калия в воздухе рабочей зоны производственных помещений (ПДК) - 0,5 мг/м.

При концентрации выше допустимой гидроокись калия может вызывать ожоги и хронические заболевания кожных покровов. Особенно опасно попадание ее в глаза.

При работе с препаратом следует применять индивидуальные средства защиты (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки), а также соблюдать правила личной гигиены.

Помещения, в которых проводятся работы с препаратом, должны быть оборудованы общей приточно-вытяжной механической вентиляцией; анализ препарата в лаборатории следует проводить в вытяжном шкафу [75].

5.3 Экологическая безопасность

Важной характеристикой экологической безопасности является влияние фармацевтических отходов.

При разработке тест-системы образуются отходы классов А, Б и Г (см. *Табл.5.3*), которые классифицируются и утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 [76].

Таблица 5.3 - Отходы фармацевтического производства АО «Вектор-БиАльгам» в зависимости от степени их эпидемиологической, токсикологической опасности, а также негативного воздействия на среду обитания

Класс опасности	Характеристика морфологического состава
Класс А (эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО)	<p>Отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными.</p> <p>Канцелярские принадлежности, упаковка, мебель, инвентарь, потерявшие потребительские свойства.</p> <p>Пищевые отходы центральных пищеблоков, а также всех подразделений организации, осуществляющей фармацевтическую деятельность</p>
Класс Б (эпидемиологически опасные отходы)	<p>Потенциально инфицированные отходы.</p> <p>Отходы из фармацевтических, иммунобиологических производств, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Биологические отходы вивариев.</p>
Класс Г (токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности)	<p>Лекарственные (в том числе цитостатики), диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию.</p> <p>Ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование. Отходы сырья и продукции фармацевтических производств. Отходы от эксплуатации оборудования, транспорта, систем освещения и другие.</p>

Сбор, временное хранение и вывоз отходов следует выполнять со схемой обращения с медицинскими отходами, принятой в данной организации, осуществляющей фармацевтическую деятельность.

Вывоз на обычную свалку или полигон отходов класса Б и Г категорически запрещается. Вывоз фармацевтических осуществляется специализированными организациями, которые обладают соответствующей технической базой и пакетом необходимой разрешающей документации. Вывозить фармацевтическую продукцию с истекшим сроком годности и не пригодную к использованию необходимо в герметичных контейнерах. Для жидких средств фармацевтического производства использовать стеклянную тару, которая плотно закрывается и обеспечивает герметичность.

Помещения, где хранятся фармацевтические отходы, должны соответствовать определенным требованиям по санитарным, пожарным и другим нормам. Наиболее оптимальным вариантом для этой цели является использование отдельного здания либо изолированного помещения, имеющего отдельный вход. Нельзя допускать смешанное хранение фармацевтических отходов на одном поддоне или стеллаже вместе с другими категориями отходов, а также их хранение на полу. Помещение для хранения фармацевтической продукции должно быть чистым, сухим и хорошо проветриваемым. Кроме этого, оно должно быть оборудовано термометрами, гигрометрами, вентиляционной и противопожарной системами, а также специальными средствами и инвентарем для перемещения фармацевтической продукции [76].

Предотвращение загрязнения окружающей среды

Минимизация отходов и предотвращение загрязнения

Эффективные технические и управленческие методы минимизируют воздействие на окружающую среду в результате крупномасштабного химического и фармацевтических производств. Для предотвращения загрязнения необходимо использовать модифицированные процессы или оборудование, многократно используемые или восстанавливаемые материалы, а также соответствующие методы обслуживания. Эти виды деятельности делают управление экологическими вопросами, а также вопросами охраны труда и безопасности, более эффективным.

Модификации процессов

Процессы могут быть модифицированы для изменения формулы продуктов путем использования материалов, которые менее опасные или стойкие, или путем изменения производственных операций для сокращения выбросов, жидких сбросов или твердых отходов. Сокращение объема токсичных отходов разумно, поскольку это увеличивает эффективность производственных процессов и сокращает затраты и воздействие при утилизации отходов.

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Одним из важнейших факторов в безопасности жизнедеятельности людей на фармацевтическом производстве является подготовленность к чрезвычайным ситуациям.

Химический взрыв

Химический взрыв – взрыв, возникающий за счет протекания химической реакции веществ или разложения вещества. Обычно характеризуется значительной разрушительной мощностью и поражающей способностью. Может приводить к пожару в лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к химическому взрыву:

- работа со взрывчатыми веществами.
- хранение кислот в металлических емкостях или пролив их на металлические поверхности приводит к выделению водорода. В замкнутом объеме может накопиться взрывоопасная концентрация. Аналогично опасно хранить щелочи рядом с металлами амфотерного характера (алюминий, цинк).

При химическом ожоге кислотой пораженное место сразу же промывают большим количеством проточной холодной воды 15-20 мин. Если кислота попала на кожу через одежду, то сначала надо смыть ее водой с одежды, после чего промыть кожу. При попадании на тело человека серной кислоты в виде твердого вещества необходимо удалить ее сухой ватой или кусочком ткани, а затем пораженное место тщательно промыть водой. При химическом ожоге полностью смыть химические вещества водой не удастся. Поэтому после промывания пораженное место обрабатывают раствором пищевой соды (одна чайная ложка на стакан воды). При попадании брызг щелочи или паров в глаза и полость рта необходимо промыть пораженные места большим количеством воды, а затем раствором борной кислоты (0,5 чайной ложки кислоты на стакан воды).

Пожар

Пожар при нагревании, прокаливании, высушивании и других работах может произойти:

- 1) от неисправности нагревательных приборов (газовых горелок, электроприборов и т.п.);
- 2) от неисправности газопроводов и электрических -проводов;
- 3) при несоблюдении мер предосторожности.

При возникновении пожара в лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. При возникновении пожара в лаборатории все огнеопасные и взрывчатые вещества должны быть убраны в безопасное место, которое следует особо предохранять от пламени.

2. Все имеющиеся под рукой средства тушения надо немедленно использовать и одновременно вызвать местную пожарную охрану.

3. Надо помнить, что горящие не растворимые в воде вещества, особенно жидкости (бензол, бензин и т.п.), тушить водой нельзя.

4. С инструкцией по обращению с огнетушителями должны быть знакомы все работающие в лаборатории.

5. Песок, заготовленный для противопожарных целей, всегда должен быть сухим, чистым и сыпучим.

6. Надо постоянно соблюдать правила противопожарной охраны и пожарного надзора.

7. Огнеопасные жидкости необходимо хранить в специально организованных местах.

8. Электрическая проводка всегда должна содержаться в исправном состоянии.

9. Нагревательные приборы, работающие на газе, а также газовые краны и газопровод должны быть исправны.

Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС

Все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 [77] и иметь необходимые средства противопожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83 [78]. Каждое рабочее помещение должно быть оснащено песком и огнетушителями, а помещения с легковоспламеняющимися и огнеопасными веществами - дополнительными средствами пожаротушения. На видном месте в помещении лаборатории должен висеть план эвакуации.

Каждый сотрудник лаборатории должен быть ознакомлен с правилами обращения с взрыво- и огнеопасными веществами, газовыми приборами, а также использовать противогаз, огнетушитель и другие средства пожаротушения, имеющимися в наличие лаборатории. В лаборатории, а также в непосредственной близости от них (под лестницами, в коридорах) строго запрещается хранение горючих материалов, и установление предметов, загромождающих пути эвакуации и доступа к средствам пожаротушения. Курение разрешается только в специально отведенных и оборудованных зонах.

Нагревательные приборы необходимо установить на термостойкую подставку. Строго запрещена эксплуатация неисправных нагревательных и лабораторных приборов.

Сотрудники лаборатории, заметивший задымление, пожар или другие признаки пожара обязаны:

- незамедлительно сообщить в пожарную часть по телефону;
- принять всевозможные меры по недопущению распространения огня;
- известить начальника лаборатории, в свою очередь который обязан известить сотрудников, принять меры по ликвидации пожара к их эвакуации;
- знать и уметь пользоваться первичными средствами пожаротушения.

Для тушения пожаров, в случае их возникновения, в лаборатории имеются порошковые огнетушители ОП-4-ABCE, предназначенные для ликвидации

пожаров твердых веществ, в основном органического происхождения (класс А); пожаров горючих жидкостей или плавящихся твердых веществ (класс В); пожаров газообразных веществ (класс С), а также пожаров электрооборудования, находящегося под напряжением не более 1000 В (пожар класса Е).

Огнетушители ОП-4-АВСЕ не предназначены для тушения загораний щелочных и щелочноземельных металлов и других материалов.

План эвакуации персонала участка производства диагностических наборов 5 этажа производственного корпуса №104 фармацевтической компании АО «Вектор-БиАльгам» при возникновении пожара представлен на рисунке 5.1.



Рис. 5.1 – План эвакуации при пожаре

Заключение

В разделе «Социальная ответственность» были рассмотрены требования безопасности, связанные с работой в лаборатории. Проанализированы вредные и опасные производственные факторы. Выявлены предполагаемые источники загрязнения окружающей среды. Также проведен анализ возможных чрезвычайных ситуаций, которые могут возникнуть при проведении научно-исследовательских работ.

Полученные результаты раздела содержат в себе основные рекомендации и указания, обеспечивающие безопасность технологического процесса и эксплуатации оборудования, и, требующие четкого их соблюдения.

Заключение

По результатам проведенного исследования:

1. Разработана схема иммунизации мышей и кроликов для получения высокотитражных сывороток к вирусу гепатита А.

2. Получены вирусспецифические иммуноглобулины (IgG кролика и IgG мыши) методами осаждения каприловой кислотой с высаливанием сульфатом аммония и препаративной хроматографией.

3. Отработаны условия постановки непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, формат I) и непрямого «сэндвич» твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич» ТИФА, формат II) при сорбции вирусспецифического биологического материала (антиген ВГА/иммуноглобулинов IgG кролика):

- оптимальными условиями при разработке модельной тест-системы для определения антител против ВГА в ТИФА I являются: проведение сорбции антигена ВГА в разведении 1:100 в КБР pH $9,6 \pm 0,1$ на планшетах для титрования фирмы Costar (США), сорбцию необходимо проводить от 18 до 20 ч при $+2-8^{\circ}\text{C}$ или при $+18-25^{\circ}\text{C}$;
- оптимальными условиями при разработке модельной тест-системы для определения антител против ВГА в ТИФА II являются: проведение сорбции IgG кролика в разведении 1:2000 в ФСБ pH $7,5 \pm 0,3$, разведение антигена в 1% растворе казеина 1:100, использование планшетов для титрования фирмы Costar (США), сорбцию необходимо проводить 4 ч при $+37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

4. Проведены сравнительные исследования по эффективности применения двух форматов иммуноферментного анализа антител к вирусу гепатита А: ТИФА I и ТИФА II.

Проведена оценка экономической эффективности данного процесса и рассмотрено воздействие разработанных аспектов деятельности с точки зрения социальной ответственности на человека и окружающую среду.

Список использованных источников

1. Кареткина Г.Н. Вирусный гепатит А в прошлом, настоящем и будущем / Г.Н. Кареткина // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. - 2014. - С.38-47.
2. Информационный бюллетень. ВОЗ. Гепатит А, 2019 [Электронный ресурс]. – Режим доступа <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>.
3. Информационный бюллетень по борьбе с гепатитом «А» для повышения осведомленности о вирусном гепатите и понимания этой болезни. ГБУЗ «ТОКБ им. В.Д. Бабенко» / Информация по материалам данных ВОЗ.
4. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines / A.L. Stuurman, C. Marano, E.M. Bunge et al. // A systematic review. Hum Vaccin Immunother. – 2017. – P.724-736.
5. Разработка культуральной инактивированной концентрированной очищенной вакцины против гепатита А «ГЕП-А-ин-Вак» / М.А. Мунтянова, Н.И. Крюк, Ю.В. Немцов, А.Г. Майданюк, В.В. Яшин, С.В. Нетесов, Л.С. Сандахчиев // Бюллетень «Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики». - №4 (16) Июль-август 2001.
6. Способ получения инактивированной вакцины против вируса гепатита А / М.А. Мунтянова, Ю.В. Немцов, Н.И. Крюк, В.В. Яшин, Л.Г. Никулин, А.Г. Куслий, В.В. Мироненко, Г.В. Ясудис, И.А. Гусева, А.В. Молокеев // Патент РФ №2314125 опубликован 01.10.2008.
7. Штамм вируса гепатита А для приготовления вакцинных и диагностических препаратов / М.А. Мунтянова, Ю.В. Немцов, Н.И. Крюк, Л.Г. Никулин, А.Г. Куслий, А.В. Молокеев, В.В. Мироненко // Патент РФ № 2405037 опубликован 27.11.2010.
8. Большая Медицинская Энциклопедия Главный редактор Б. В. Петровский, издание третье, онлайн версия <https://бмэ.орг/index.php> //

Источник: Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ), под редакцией Петровского Б.В., 3-е издание.

9. Желтуха это какой гепатит [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: http://pryshoff.ru/info/zheltuha-jeto-kakoj-gepatit/](http://pryshoff.ru/info/zheltuha-jeto-kakoj-gepatit/)
10. Вирусные гепатиты: история изучения болезни / А.Блюгер, И.Новицкий // [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://www.hv-info.ru/info/statyi/pechen-diagnostika/gepatit-istoriya.html](https://www.hv-info.ru/info/statyi/pechen-diagnostika/gepatit-istoriya.html)
11. История изучения гепатитов [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://meduniver.com/Medical/Microbiology/1364.html](https://meduniver.com/Medical/Microbiology/1364.html)
12. McCallum, F.O. A brief summary of the epidemiology of virus hepatitis / Schweiz Z Pathol Bakteriол. – 1953. - 16(3):274-84.
13. История распространения гепатита: уделим внимание прошлому [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://gepa-net.com/istoriya-rasprostraneniya-gepatita-udelim-vnimanie-proshlomu!.html](https://gepa-net.com/istoriya-rasprostraneniya-gepatita-udelim-vnimanie-proshlomu!.html)
14. Гепатит А. Клиника и диагностика гепатита А [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://meduniver.com/Medical/Microbiology/1365.html](https://meduniver.com/Medical/Microbiology/1365.html)
15. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness / S.M. Feinstone, A.Z. Kapikian, R.H. Purceli // Science. – 1973 Dec 7. - 182(4116):1026-8.
16. Feinstone, S.M. History of the Discovery of Hepatitis A Virus / Cold Spring Harb Perspect Med. - 2019 May 1;9(5).
17. Cellular Membrane Trafficking Machineries Used by the Hepatitis Viruses / J. Inoue, M. Ninomiya, T. Shimosegawa et al. // Hepatology. – 2018. - P.751-762.
18. Кипайкин В.А., Рубашкина Л.А. Эпидемиология: учебное пособие для студентов медицинских училищ и колледжей / Изд. «Феникс», Ростов-на-Дону. - 2002. - 480 с.
19. Гепатит А (памятка) [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: http://cgon.rospotrebnadzor.ru/content/16/1254/?sphrase_id=251216.](http://cgon.rospotrebnadzor.ru/content/16/1254/?sphrase_id=251216)

20. Zell R. Picornaviridae-the ever-growing virus family // Arch Virol. – 2018. - P.299-317.
21. Гепатит А [Электронный ресурс] – Режим доступа www.URL:https://studopedia.su/19_21249_gepatit-a.html.
22. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses / X. Wang, J. Ren, Q. Gao et al. // Nature. – 2015. P.85-88.
23. Genus: Hepatovirus [Электронный ресурс] – Режим доступа www.URL:https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/709/genus-hepatovirus.
24. Taxonomy Release History [Электронный ресурс] – Режим доступа www.URL:https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases.
25. Руководство по вирусологии / Д.К. Львов, К.П. Алексеев, Л.М. Алибарова и др. // «Медицинское информационное агентство», - М., -2013. - 1197 с.
26. Genetic variability of hepatitis A virus / M. Costa-Mattioli, A. Di Napoli, V. Ferré et al. // J Gen Virol. – 2003. - 84(Pt 12):3191-201.
27. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions / B.H. Robertson, R.W. Jansen, B. Khanna et al. // J Gen Virol. – 1992. - 73 (Pt 6):1365-77.
28. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein / M. Costa-Mattioli, J. Cristina, H. Romero et al.// J Virol. – 2002. - 76(18):9516-25.
29. Mixed infection of a child care provider with hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB revealed by heteroduplex mobility assay / V. S. de Paula, F. L. Saback, A. M. Gaspar & C. Niel // J Virol Methods. – 2003. - 107:223–228.
30. Taylor, M.B. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982–1996 // J Med Virol. – 1997. – P.273–279.

31. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak / G. Sanchez, R.M. Pinto, H. Vanaclocha & A. Bosch // *J Clin Microbiol.* – 2002. – P.4148–4155.
32. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines - A systematic review / A.L. Stuurman, C. Marano, E.M. Bunge et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2017. – P.724-736.
33. Hepatitis A vaccine immune response 22 years after vaccination / E. Mosites, P. Gounder, M. Snowball et al. // *J Med Virol.* – 2018. – P.1418-1422.
34. Prevention of hepatitis A by Havrix: a review / K. Van Herck, P. Van Damme // *Expert Rev Vaccines.* – 2005. – P.459-71.
35. Диагностика и лечение печени и желчного пузыря [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://zpmед.ru/lechenie-pecheni/privivka-ot-gepatita-a-detyam.html](https://zpmед.ru/lechenie-pecheni/privivka-ot-gepatita-a-detyam.html).
36. Effect of hepatitis A vaccination programs / P. Van Damme, K. Van Herck // *JAMA.* - 2005; 294:246-8.
37. Effect of Hepatitis A Vaccination Programs [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: http://dx.doi.org/10.1001/jama.294.2.246](http://dx.doi.org/10.1001/jama.294.2.246).
38. Хаврикс® (вакцина против гепатита А инактивированная) (Havrix®) [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_7068.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_7068.htm).
39. Inactivated candidate vaccines for hepatitis A / F.E. André, A. Hepburn, E. D'Hondt // *Prog Med Virol.* – 1990. – P.72-95.
40. Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants / J. Graff, A. Normann, S.M. Feinstone et al.// *J Virol.* – 1994. - 68(1):548-54.
41. Evaluation of the purity of a purified, inactivated hepatitis A vaccine (VAQTA) / JP.Jr. Hennessey, C.B. Oswald, Z. Dong et al. // *Vaccine.* – 1999. - 17(22):2830-5.

42. Альгавак - инструкция по применению [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://medi.ru/instrukciya/algavak_15829/](https://medi.ru/instrukciya/algavak_15829/).
43. Вакцина гепатита А [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: http://www.bialgam.ru/index.php?id=9](http://www.bialgam.ru/index.php?id=9).
44. Establishment of a biological reference preparation for hepatitis A vaccine (inactivated, non-adsorbed) / J. Stalder, A. Costanzo, A. Daas et al. // *Pharmeur Bio Sci Notes*. – 2010. – P.15-29.
45. Establishing the 1st Chinese National Standard for inactivated hepatitis A vaccine / F. Gao, Q.Y. Mao, Y.P. Wang et al.// *Biologicals*. – 2016. – P.198-205.
46. Вакцина для профилактики гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая // *ФС.3.31.0029.15 ГФ XIII*. – Том IV. – С.5419.
47. СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов.
48. Would an in vitro ELISA test be a suitable alternative potency method to the in vivo immunogenicity assay commonly used in the context of international Hepatitis A vaccines batch release? / B. Poirier, P. Variot, P. Delourme et al.// *Vaccine*. – 2010. - 28(7):1796-802.
49. Establishment of the European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (Ph. Eur. BRP) for hepatitis A vaccine type B (Aventis Pasteur) batch 2 / K.H. Buchheit, A. Daas // *Pharmeuropa Spec Issue Biol*. - 2002; (1):95-108.
50. Establishment of detection antibodies BRRs batch 5 for in vitro potency assay of hepatitis A vaccines by ELISA / S. Morgeaux, A. Koy, I. Manniam et al.// *Pharmeur Bio Sci Notes*. – 2019. – P.1-10.
51. Принципы иммуноферментного анализа, основные виды ИФА, применение в диагностике [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://www.bibliofond.ru/view.aspx?id=134962#_Toc239413791](https://www.bibliofond.ru/view.aspx?id=134962#_Toc239413791).

52. Иммуноферментный анализ / авт. Koyaanis Katsi [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://medach.pro/post/2047](https://medach.pro/post/2047).
53. Электрофорез в полиакриламидном геле Katsi [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез_в_полиакриламидном_геле](https://ru.wikipedia.org/wiki/Электрофорез_в_полиакриламидном_геле).
54. Электрофорез в полиакриламидном геле [Электронный ресурс] – Режим доступа [www.URL: https://present5.com/elektroforez-v-poliakrilamidnom-gele-elektroforez-v-poliakrilamidnom/](https://present5.com/elektroforez-v-poliakrilamidnom-gele-elektroforez-v-poliakrilamidnom/).
55. Остерман А.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование // Москва, - 1981. - С.37-64.
56. Федеральный закон от 30 декабря 2001 года №197-ФЗ Кодекс РФ от 30 декабря 2001 года №197-ФЗ.
57. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств (GMP).
58. Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
59. Постановление от 16 декабря 1997 года N 63 «Об утверждении Типовых отраслевых норм бесплатной выдачи работникам специальной одежды, специальной обуви и других средств индивидуальной защиты» (с изменениями на 5 мая 2012 года).
60. ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация».
61. ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения).
62. СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.
63. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03 Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий.

64. ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.
65. ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.
66. ГОСТ Р 51609-2000 Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования.
67. ГОСТ Р 52905-2007 Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
68. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.1998.
69. МУ 42-51-8-93 Применение бактерицидных ламп.
70. ГОСТ Р 55064-2012 Натр едкий технический. Технические условия.
71. ГОСТ 12.4.131-83 Халаты женские. Технические условия.
72. ГОСТ 4204-77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия.
73. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
74. ГОСТ 2184-2013 Кислота серная техническая. Технические условия.
75. ГОСТ 24363-80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия.
76. СанПиН 2.1.7.2790-10 Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами.
77. ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования.
78. ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание.

Приложение А

(справочное)

Development of immunoenzyme test system for immunogenicity analysis of viral hepatitis A vaccine

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ83	Крупницкая Юлия Александровна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Дорожко Е.В.	к.х.н., доцент		

Консультант – лингвист отделения иностранных языков ШБИП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОИЯ	Терре Д. А.	к.ф.н., доцент		

1.1. Hepatitis A

Hepatitis - general designation of acute and chronic inflammatory liver diseases of various etiologies. The most common symptom in hepatitis is jaundice, which occurs when bilirubin (yellow pigment, which is normally formed as a result of cleavage of proteins containing heme: hemoglobin, myoglobin and cytochrome) is not processed in the liver, enters the bloodstream and gives the skin a characteristic yellowish hue.

The history of hepatitis goes deep into antiquity. Back in the V century BC Hippocrates wrote about the infectious form of jaundice. In the middle of the 1st millennium AD in a letter from Pope Zechariah it was recommended to isolate patients with jaundice. In the XVII-XIX centuries, during the wars, epidemics of jaundice were observed in many countries in Europe and America. Epidemics covered large contingents of troops and were accompanied by high lethality. Jaundice called "soldier" disease, or "military" jaundice. The epidemic nature of jaundice was already noticed at that time, but the insufficient level of knowledge did not allow us to even come close to deciphering the nature of this disease.

Russian general practitioner Botkin S.P. (1832-1889. Life) at the end of the XIX century (1883-1884) in his clinical lectures, even before the discovery of viruses by Ivanovsky D.I. (in 1892), came to the conclusion that the yellow catarrh, which primarily takes the gastrointestinal catarrh, is actually an acute infectious disease. In 1937, Findlay D. and McCallum F. O. in experiments on volunteers showed that infection with filtrates of the contents of the duodenum of patients with hepatitis, occurring with jaundice, leads to the development of a similar disease. Thus, the viral nature of the disease was proved, but the isolation of the virus itself failed for a long time. The viral etiology of the disease was convincingly justified by Sergiev P. G., Tareev E. M. and Gontaeva A. A. (in 1940) when studying jaundice in the Crimea in vaccinated against pappatachi fever with a vaccine that turned out to contain human blood serum.

In 1947, McCallum F.O. proposed a classification of hepatitis (diseases): type A - for infectious disease transmitted through infected products, water and fecal-oral

route (through dirty hands) from person to person; type B - for serum disease (i.e. transmitted through the blood) [12], which has had a huge impact on the study and differentiation of these diseases. The idea of Botkin S.P. about the infectious nature of yellow and brilliantly confirmed after the discovery by Bloomberg W. in 1964 of the so-called Australian antigen in Aborigines in Australia. This protein (HbsAg) turned out to be a surface antigen of the virus that causes hepatitis B. Soon, in 1970, Dane D. discovered that in the blood and tissues there are viruses that cause spherical and polygonal formations (they are called Dane particles), which have an infectious and diverse antigenicity. The virus was named hepatitis B.

In 1973, Feinstone S. in the feces of a patient with infectious hepatitis A (in the acute phase of the disease) by electron microscopy identified the etiological agent of the disease - a virus in the form of spherical 27-nanometer particles, which was also named after the disease - hepatitis A virus [15;16]. Later, hepatitis viruses were found - D, E, C, and others. All these pathogens lead to severe liver damage, but differ from each other in the structure of the viral particle and its genetic material (i.e., they belong to different viral families), in the mechanism of infection and transmission routes, pathogenesis and immunogenesis, clinical manifestations and severity of the disease, with the probability of transition to a chronic form and cancer [17].

Viral hepatitis A (HAV) or Botkin's disease is an anthroponous infectious disease, i.e. developing only in man. The source of infection is virus carriers and patients at the end of the incubation period (which lasts from 7 to 50 days), especially in the icteric period. The excretion of viruses with feces begins just in this period.

The etiological agent of this disease, the **hepatitis A virus (HAV)**, is relatively stable in the external environment: it can persist for several months at a temperature of 4°C, for several years at minus 20°C, and for several weeks at room temperature. The virus also inactivates upon boiling for 5 minutes and for an hour at a concentration of 0.5-1.5 mg / l of residual chlorine in water. HAV is highly contagious: only a few infectious particles are sufficient for infection. In the vast majority of cases (about 95%), the virus is introduced into the human body through the mouth and then enters

the stomach. Being acid-resistant, it easily overcomes the gastric barrier, enters the small intestine, is absorbed into the bloodstream and through the portal portal vein system of the liver, in the cells of which it is replicated. On the hepatocyte membrane there are isolated receptor viruses to which it is attached and penetrates the liver cell. In the hepatocyte cytoplasm, the virus is decapsidated, viral RNA is released and its transcription begins. Viral proteins are synthesized and assembled in new capsids, each of which contains daughter RNA molecules. Some of the newly formed viral particles enter the feces with bile and are released from the body, while others infect neighboring hepatocytes. Immunity after a disease is strong and long-lasting, almost life-long.

The main clinical signs of the disease: the onset of acute, fever up to 39°C, headache, muscle pain, decreased appetite, nausea, vomiting, belching, pain in the right hypochondrium, urination, light stool, yellowness of the skin and mucous membranes by 5 - 7 days of illness, enlarged liver, less often – spleen. Complications for HAV are not typical, the most severe of them - hepatic coma - is very rare. Possible complications include functional and inflammatory diseases of the biliary tract. Individuals with impaired T-suppressor function may develop active type I autoimmune hepatitis during and / or after the disease. Summer outcome from HCV is extremely rare, but, nevertheless, the likelihood of age groups and patients with previous liver diseases (alcoholic liver disease, chronic hepatitis with etiology). The cause of death may be cerebral edema in patients with acute liver failure, acute hepatic encephalopathy. HAV is one of the most common human diseases on all continents (Fig. 1.1). About 1.5 million cases are recorded annually in the world. Characteristic epidemiological features - autumn seasonality and periodicity: the increase in morbidity is recorded usually every 5 - 6 - 10 years. In tropical and subtropical regions, seasonality is not expressed or timed to the rainy period. Rospotrebnadzor recommends vaccination 2 to 4 weeks before travel to endemic areas of the world and non-prosperous VGA territory of the Russian Federation (Fig. 1.2).

The Russian Federation as a whole is classified as a region with average endemicity for HAV, and it occupies a dominant position in the etiological structure of

viral hepatitis (55.3% in 2009, 62.1% in 2012). Compared with 2001, the incidence of HAV in Russia in 2012 increased by 27% (among children by 30%), which is significantly higher than in many European countries and in the United States. The frequency of HAV accession to chronic hepatitis B and C is from 1 to 4.8% (in Moscow and St. Petersburg-11-16.3%, respectively). In our country, according to experts, the total number of people infected with hepatitis B and C viruses can reach 8-10 million, and 30-40% of them may be susceptible to HAV.

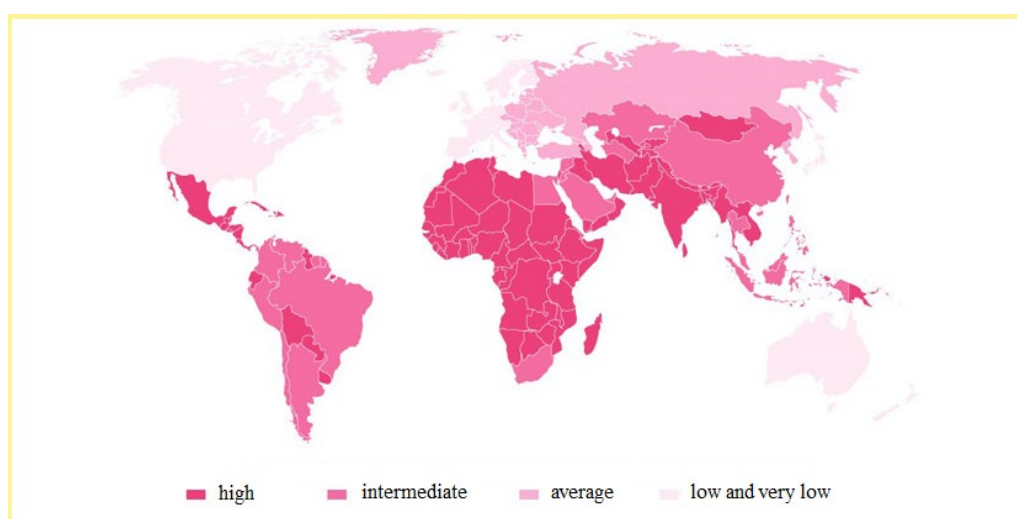


Fig. 1.1 - Spread of hepatitis A virus in various countries of the world

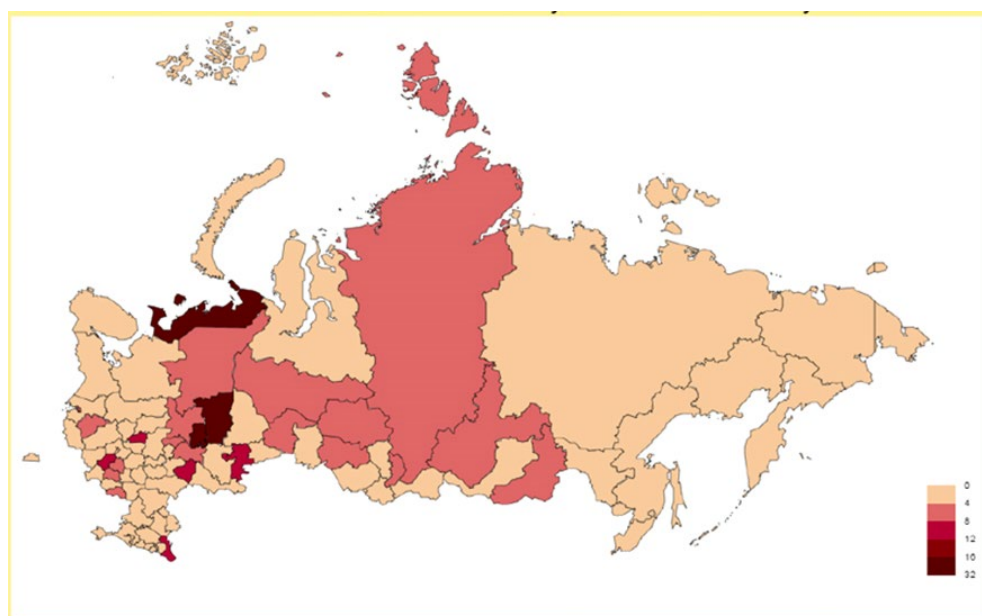


Fig. 1.2 - The incidence of hepatitis A in Russia (2016)

1.2. Vaccines

Recovery from HAV-induced illness can be slow and take several weeks or months. There is no specific treatment for VGA, so the most effective means of combating this infection are to observe personal hygiene rules (washing hands before eating and after visiting the toilet), to provide the population with safe drinking water and food, and to expand vaccination coverage. WHO recommends to include general mass vaccination against VGA in national plans of immunization of children at the age of ≥ 1 year if it is justified on the basis of data on a region endemismity. This recommendation was implemented in several countries - Argentina, Belgium, China, Greece, Israel, Panama, Uruguay and the United States [32]. In the United States, for example, the incidence of HAV has been reduced through universal vaccination of children over a 22-year period [33].

Havrix, the first commercially available vaccine, was launched in 1992 by GlaxoSmithkline in Belgium [34]. Several inactivated injection vaccines against HAV are currently available on the international market (Table 1.1). These vaccines are also registered for use in the Russian Federation. No hepatitis A vaccine was licensed for children under 1 year of age (Table 1.2). There are several monovalent inactivated vaccines that are licensed for children aged one year or older. Antigen content varies between vaccines, but all are considered safe and immunogenic. Vaccines are similar to each other in terms of effectiveness and a range of side effects, the differences are in the degree of purification and concentration. Long-term persistence of antibodies in the blood was shown when using 2-dose vaccination regimens in adults [32]. Most countries use inactivated vaccines against HAV, but the live attenuated oral vaccine is mostly used in China [36].

Table 1.1 - *HAV vaccines registered for use in the Russian Federation*

Appellation	Producer	Strain HAV	Culture of cells	Inactivation / adsorption	Concentration of viral antigen in one dose
Havrix	GlaxoSmithkline, Belgium	HM175	MRS5	formalin / aluminum hydroxide	720 U (children's) 1440 U (adult)

Avaxim	Pasteur Merieux Connaught, France	GBM	MRS5	formalin / aluminum hydroxide	160 U
Vaqta	Merck, USA	CR326	MRS5	formalin / aluminum hydroxide	25 U (children's) 50 U (adult)
ALGAVAK®M	Production Unit "Vector- BiAlgam", Russia	HAV № VBG-07	4647	formalin / aluminum hydroxide	320 U * (adult) 160 U (children)

Notes: MRS5 - human diploid cells;

4647 - transplantable kidney cells of green monkey;

U is the unit of action (or ME is the international unit) - in pharmacology the unit of measurement of the dose of the substance based on its biological activity; Here, determination by a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA).

Table 1.2 - Age restrictions, doses, vaccination regimens, and duration of immunity when using HAV vaccines

Appellation	Age	Dose	Schedule	Duration of action
Havrix	children 1-16 years old	0.5 ml	two vaccinations with an interval of 6-12 months	up to 20 years
	adults 16-55 years old	1 ml		
Avaxim	children and adults from 2 to 55 years old	0.5 ml	two vaccinations with an interval of 6-18 months	up to 10 years
Vaqta	children 1-18 years old	0.5 ml	two vaccinations with an interval of 6-18 months	for 6 years
	adults 18-55 years old	1 ml		
ALGAVAK®M	children 3-17 years old	0.5 ml	two vaccinations with an interval of 6-12 months	10 to 15 years
	adults 18-50 years old	1 ml	two vaccinations with an interval of 6-12 months	

In our country, research on the development of VGA vaccine prevention agents was initiated at the Institute of Polio and Viral Encephalites of RAMN in the early 1980s. As a starting material for the preparation of inactivated vaccine, a strain of HAS15 cultured on the transferred culture of 4647 (green monkey kidney cells) was

chosen. The basic technological scheme of vaccine preparation was developed, the first laboratory series of inactivated culture vaccine "HEP-A-in-VAC" were produced and studied. After successful laboratory certification and the first clinical and immunological tests, the development of the vaccine in the laboratory version was transferred to the SRC VB Vector, where, with the support of company "Biopreparation", the preparation of a material base for the production of inactivated vaccine on an industrial scale, meeting the requirements of WHO, with the aim of introducing it into the practice of Russian medicine began. The finished vaccine "HEP-A-in-VAK" is a suspension of inactivated purified virions adsorbed on aluminum hydroxide (its content is from 0.5 to 0.65 mg / ml). From 1997 to October 2011, at the "Vektor" and "Vector-Bialgam" organized the production of the first domestic vaccine, which stimulated the formation of specific antibodies in the body, providing stable, long-lasting immunity (for at least 10-15 years). In terms of its qualities, the "HEP-A-in-VAK" vaccine did not differ from its foreign counterparts; the prophylactic efficacy was 98%.

Later, company Vector-Bialgam obtained a new HBV strain no. IBC-07 with a higher productivity of viral crop accumulation and a shorter cultivation period on the transplanted culture 4647. The strain is certified and licensed for the production of vaccines inactivated with formalin and sorbed with aluminum hydroxide. The HAV antigen content in a single dose of the vaccine was estimated in ELISA units (U) - at least 80 U for adults and at least 40 U for children. We used the ELISA test system "Vectogep-A-antigen" of our own production. Since 2011 the ALGAVAK®M vaccine is produced on the basis of HAV strain no. VBG-07 (Fig. 1.9). In the instructions (May 16, 2019) for the use of the vaccine, 1 vaccination dose for adults (1 ml) contains an inactivated hepatitis A virus antigen (HAV) - at least 320 U, 1 vaccination dose for children (0.5 ml) contains inactivated hepatitis A virus antigen (HAV) - at least 160 U.



Fig. 1.9 - Vaccine for hepatitis A prevention

As can be seen from the data presented in the table. 1, HAV antigen concentrations differ in vaccines from different manufacturers. But all of them are presented in units of action (U corresponding to UI - unit international), as is customary in pharmacology for the unit of measurement of a substance's dose based on its biological activity. In this case, the U are determined by test systems based on the method of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of commercial or in-house production.

According to the literature, in 2009, a reference vaccine preparation based on inactivated HAV was developed and adopted as a standard at the session of the European Pharmacopoeia for the analysis and comparison of the antigen content in production batches of vaccines by the ELISA method. At the same time, parallel use of validated test systems of own or commercial production is not prohibited. The recommended antigen concentration in a single dose of the vaccine is at least 12 UI / ml when compared with the European standard [44]. In 2016 the first Chinese national standard with an antigen content of 70 UI was adopted [45].

The requirements for the vaccine for the prevention of hepatitis A culture purified concentrated absorbed inactivated liquid, according to FS.3.31.0029.15 Pharmacopoeia article XIII (PhA XIII), are presented in table 1.3.

Table 1.3 - Requirements for a vaccine for the prevention of hepatitis A

Indicators	Methods	Norms
1	2	3
Description	Visual, PhA XIII	Slightly opalescent suspension, when sedimented, it is divided into 2 layers: the top is a transparent, colorless liquid; lower - white precipitate, easily broken when shaken, without the formation of flakes and impurities
Genuineness	Biological, Method of enzyme immunoassay, PhA XIII	The drug should be identical to the antigen of hepatitis A virus and should induce the formation of antibodies to hepatitis A virus in mice
pH	Potentiometric, PhA XIII	7,0 to 7,6
Recoverable volume	Volumetric, PhA XIII	Not less than nominal (0.5 ml; 1 ml)
Passability through the needle	Visual, PhA XIII	The vaccine suspension should pass freely into the syringe through a 0.8x40 needle
Sedimentation stability	Visual, PhA XIII	The vaccine suspension resulting from shaking should not exfoliate for at least 5 minutes
Sterility	Direct seeding method, PhA XIII	The vaccine must be sterile
Pyrogenicity	Biological, PhA XIII	The vaccine should be pyrogen-free
Abnormal toxicity	Biological, PhA XIII	The vaccine should not be toxic
Specific activity: Determination of antigen content for HAV	Method of enzyme immunoassay, PhA XIII	There must be at least 320 ELISA UNITS in 1 dose of the vaccine for adults and at least 160 ELISA UNITS in 1 dose of the vaccine for children. The ratio of the HAV antigen content in 1 ml of the vaccine to the HAV antigen content in SEO N BTCD 065* should be in the range from 0.66 to 1.66.
or		ID50 must be at least 6
Immunogenic activity	Biological, PhA XIII	The ratio of ID50 in the tested vaccine to ID50 in SEO N BTCD 065 should be in the range of 0.33 to 3
Completeness of sorption of antigen	Method of enzyme immunoassay, PhA XIII	The amount of unbound HAV antigen in the vaccine should be

		no more than 6% of the total amount of HAV antigen
Substances added to the preparation: Formaldehyde	Colorimetric, PhA XIII	Not more than 0.15 mg/ml
Aluminum hydroxide (in terms of Al ³⁺)	Complexometric, PhA XIII	0.35 to 0.65 mg / ml
Production strain		Strain LBA-86
Packaging	0.5 ml (1 children's dose); 1 ml (1 adult dose) in ampoules. 10 ampoules with insert "snake" from cardboard in cardboard boxes with instructions for use and ampoule scarifier (if necessary)	
Marking	In accordance with ND	
Transportation	In accordance with SP 3.3.2.3332-16 at a temperature of 2 to 8 ° C. Do not freeze	
Storage	In accordance with SP 3.3.2.3332-16 at a temperature of 2 to 8 ° C. Do not freeze	
Shelf life	2 years	

1.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

An enzyme-linked immunosorbent assay in the production and quality control of a vaccine is used both to determine the antigen content in semi-finished products and the finished vaccine, and to determine the induction of antibodies in the study of the immune response to drug administration.

Quantitative measurement of the antigen content in production batches is necessary to assess the potency of immunogenicity of vaccines. In 1997, a European Pharmacopoeia article was adopted on the "gold standard" for the analysis of this potency in vivo in mice. The effectiveness of each batch of vaccine is determined by measuring the level of specific antibodies induced by immunization of animals in ELISA [48]. And this level of specific antibodies is compared with the level of activity when immunizing animals with a standard vaccine preparation. To compare the immunogenicity of vaccines (detection of antibody titers), ready-made ELISA test systems of commercial or in-house manufacture are used [49;50].

The method is based on specific binding of an antibody to an antigen, while one of the components is conjugated with an enzyme, as a result of the reaction with the

corresponding chromogenic substrate, a colored product is formed, the amount of which can be determined spectrophotometrically (Fig. 1.10).

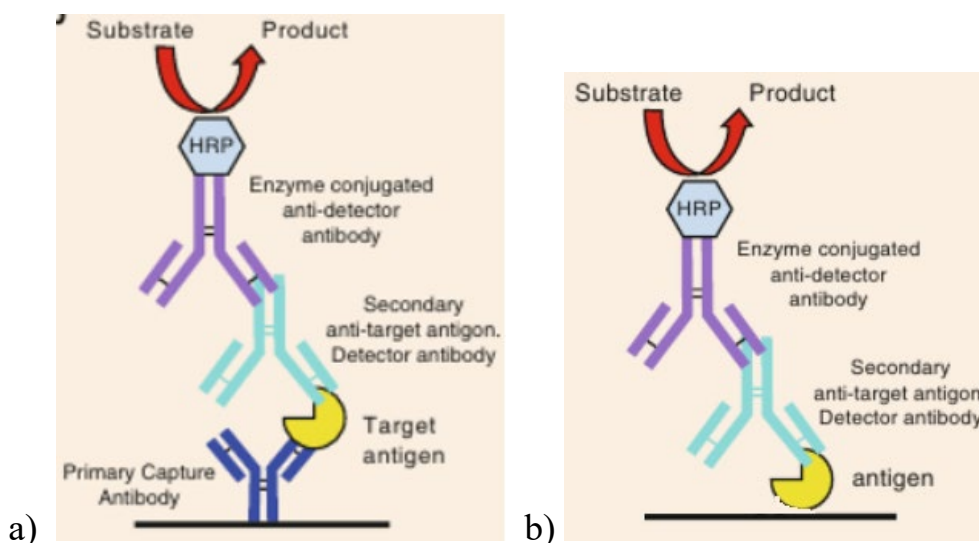


Fig. 1.10 - Basic principle of the ELISA

- a) Indirect sandwich ELISA
- b) Indirect ELISA in generating light signal from plate-immobilized antigen

The discovery of the possibility of immobilization of antigen and antibody on various carriers while preserving their binding activity has allowed to expand the use of ELISA in various fields of biology and medicine. The appearance of monoclonal antibodies served to further develop ELISA, which allowed to increase its sensitivity, specificity and reproducibility of results. Theoretically, the ELISA is based on the data of modern immunochemistry and chemical Enzymology, knowledge of the physical and chemical laws of the antigen-antibody reaction, as well as on the main principles of analytical chemistry. The sensitivity of ELISA and its timing is determined by several main factors: kinetic, thermodynamic characteristics of the antigen-antibody reaction, ratio of reagents, enzyme activity and resolution of its detection methods. The variety of research objects from low-molecular compounds to viruses and bacteria, as well as an unusually wide range of tasks associated with a variety of conditions for the use of ELISA, lead to the development of an extremely large number of variants of this method.

Any variant of ELISA contains 3 mandatory stages:

1. The stage of recognition of the studied compound by a specific antibody

2. The stage of formation of the conjugate bond with the immune complex or with free binding sites
3. Stage of transformation of an enzyme label into a registered signal

Involved in the reaction:

- Solid phase
- Antigen and Antibodies
- Conjugate (antigen or antibody labeled with an enzyme)
- Enzyme marker
- Substrate
- Stop-reagent (most often used sulfuric acid)

Solid phase

As a solid phase for conducting ELISA, various materials can be used: polystyrene, polyvinyl chloride, polypropylene and others. The solid phase can be the walls of the tube, 96-well and other tablets, balls, beads, as well as nitrocellulose and other membranes that actively sorb proteins.

Antigens and Antibodies

The antigens and antibodies used in ELISA must be highly purified and highly active. Antigens must have high antigenicity, optimal density of location, and the number of antigenic determinants.

The sensitivity of the ELISA depends on the concentration, activity, and specificity of the antibodies used. The antibodies used can be poly - or monoclonal, of various classes (IgG or IgM) and subclasses (IgG1, IgG2).

The sensitivity and specificity of the method increases when using monoclonal antibodies. In this case, it is possible to detect low concentrations of antigen (antibodies) in the samples.

Enzyme markers: horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (ALP) and β -D-galactosidase are most commonly used.

Substrates

The choice of substrate is primarily determined by the enzyme used as the label, since the "enzyme-substrate" reaction is highly specific.

For horseradish peroxidase, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB Chromogen) is used as a substrate. A color reaction occurs, the intensity of which depends on the amount of bound substance being determined.

For alkaline phosphatase, the substrate is 4-nitrophenyl phosphate.

β -D-galactosidase catalyzes the hydrolysis of lactose to form glucose and galactose.

1.4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Electrophoresis in polyacrylamide gel is used to control the purity of immunoglobulins.

Electrophoresis of proteins

The method is based on the fact that at a certain value of pH and ionic strength of the solution, proteins move in an electric field at a speed proportional to their total charge. Proteins with a total negative charge move to the anode (+), and positively charged proteins move to the cathode (-).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) - a method of molecular biology and biochemistry used to separate proteins and nucleic acids, based on the movement of charged biological macromolecules in a constant electric field. Separation in a polyacrylamide gel occurs due to differences in the charge of the molecules being separated and differences in molecular masses, as well as from the configuration of the molecules. Separate non-denaturing or native PAGE electrophoresis (in which the separated biological macromolecules remain in the native state during electrophoresis) and denaturing PAGE electrophoresis (in which the samples are pre-denatured, in the case of nucleic acids, short heating of the sample with formamide or glyoxal is used, to denature the proteins, usually boiling the sample in a buffer containing a strong ionic detergent (usually sodium dodecyl sulfate) and an agent that destroys the quaternary

structure of the protein due to the destruction of disulfide bridges between the globules of the protein and inside the polypeptide chain - betamercaptoethanol).

The resolution of polyacrylamide gel electrophoresis is higher than on paper.

Features of polyacrylamide gel electrophoresis

PAGE has many qualities of an ideal carrier. Having molecular sieve properties, it provides electrophoretic separation of protein mixtures not only in charge, but also in particle size and shape. In PAGE, large molecules, the sizes of which are commensurate with the diameter of the pores of the gel, move more slowly, and small molecules freely and quickly pass through the pores of the gel. PAGE is formed by copolymerization of acrylamide (creating a linear "base") and N, N'-methylenebisacrylamide (serving for cross-linking of linear chains). $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ Acrylamide N, N' - methylenbisacrylamide. By changing the concentration of acrylamide from 2 to 50%, you can set a certain porosity of the gel. For example, the pore diameter in a gel containing 7.5% acrylamide is 5 nm, and 30% acrylamide is 2 nm. When choosing a gel concentration, the average molecular weight (M_r) of the substances to be separated and the shape of their molecules are taken into account.

Electrophoresis

Most often, the separation is performed on plates covered with a layer of gel with a thickness of 2 -3 mm. the plate Size is 10 x 14 cm or otherwise, depending on the device design. During electrophoresis, the gel plate is heated as a result of current flowing through it. The degree of heating of the plate depends on the voltage at which the separation occurs. The higher the voltage, the higher the current flowing through the plate and its heating is stronger, therefore, the use of high voltages should be accompanied by cooling of the plate to prevent thermal denaturation of the separated proteins. The magnitude of the advancement of proteins in the gel depends (ideally) only on the magnitude of the imposed potential and time. With a potential of 500 V, the separation can end in 4 hours, and with a potential of 150 V it will take about 14 hours.